

**Zur Kenntnis der Teilaktivitäten und der
Untereinheiten des Multienzymkomplexes
Fettsäuresynthetase aus Hefe**

Klaus Ulrich Weithmann

1974
—



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551925_0053

ZUR KENNTNIS DER TEILAKTIVITÄTEN UND DER
UNTEREINHEITEN DES MULTIENZYMKOMPLEXES
FETTSÄURESYNTHETASE AUS HEFE

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Klaus Ulrich Weithmann
aus
München

1974



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Lynen
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Nov. 1974

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter
Anleitung von

Herrn Prof. Dr. Feodor Lynen
am Max-Planck-Institut für Biochemie und am Biochemischen
Institut der Universität München in der Zeit von März 1970
bis Januar 1974 ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer danke ich herzlich für das
Interesse und die Unterstützung, die er meiner Arbeit und
mir jederzeit gewährte.

Frau H. Brodowski danke ich für zeitweise Mitarbeit.
Fräulein M. Stürzer danke ich für ihre sehr zuverlässige
und geschickte Mitarbeit seit Mai 1973.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Die Teilreaktionen der Fettsäuresynthetase	5
I. Die reduzierenden Komponenten des Multienzymkomplexes	5
1. Spezifität verschiedener Modellthioester	6
2. Pyridinnukleotidspezifität	9
3. Zur Reversibilität der Modellreaktionen	14
4. Die kinetisch definierten Reaktionskonstanten der 3-Ketoacylreduktion	15
II. Kondensation	19
III. 3-Hydroxyacyldehydratase	21
1. Dehydratase	21
2. Hydratase	22
IV. Die Acyltransferasen	23
1. Vorbemerkungen	23
2. Malonyltransferase	24
a) Darstellung der Substrate. Gleichgewichtslage der Transferreaktion	24
b) Nachweis von C-14-Malonylpantethein und Coenzym A als Produkte der Modellreaktion	24
c) Charakterisierung der Malonyltransferase	30
3. Die Übertragung des Malonsäurerestes auf die zentrale SH-Gruppe. Hemmung durch Coenzym A.	32
4. Acetyltransferase	34
a) Radioaktive Bestimmungsmethode	34
b) Optische Bestimmungsmethode	37
5. Palmityltransferase. Einige Messungen zur Spezifität dieses Teilenzymes	41
6. Die Wirkung von Hemmstoffen auf die Aktivität der Acyltransferasen	43
a) Der Serininhibitor Phenylmethan-sulfonylfluorid	43
b) Das Schwefelgift N-Äthylmaleinimid	43
C. Die enzymatischen Aktivitäten des in Untereinheiten gespaltenen Multienzymkomplexes	45
1. Vorbemerkung zur Spaltung	45

	Seite
2. Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge	50
a) Bestimmung der Sedimentationskonstanten des nativen Enzymes	50
b) Molekulargewichtsbestimmung des nativen Enzymes	50
c) Bestimmung der Sedimentationskonstanten des LiCl-gespaltenen Enzymes	51
3. Die enzymatischen Aktivitäten des mit LiCl in Untereinheiten gespaltenen Enzymkomplexes	53
a) Reaktivierungsparameter	53
b) Native und gespaltene Synthetase: Vergleich der Teilaktivitäten	56
c) Zusammenfassung der Befunde	60
d) Das Verhalten der enzymatischen Aktivitäten bei der Reaktivierung der gespaltenen Fettsäuresynthetase	61
4. Zur präparativen Trennung der Spaltprodukte	66
5. Diskussion	68
D. Experimentelle Einzelheiten	70
1. Geräte	70
2. Handelsübliche Materialien	71
3. Synthese von Substraten	71
a) N-Capryloylcysteamin-Derivate	71
b) Coenzym A-Derivate	73
c) Pantetheinderivate	75
d) N-Acetylcysteaminderivate	77
4. Allgemeine analytische Methoden	77
a) Proteinbestimmung	77
b) Gehaltsbestimmung von Substraten und Präparaten	78
c) Radioaktivität	78
d) Papier- und Dünnschichtchromatogramme	79
e) Disk- und SDS-Gelelektrophorese	79
5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung der Fettsäuresynthetase	80

	Seite
6. Zu Abschnitt B, Beschreibung der Modellreaktionen	83
a) 3-Ketoacylreduktase	83
b) 3-Hydroxyacyldehydrogenase	83
c) 2,3-Enoylreduktase	83
d) Transhydrogenase	84
e) Triacetsäurelactonbildung	84
f) Kondensation	84
g) 3-Hydroxyacyldehydratase	84
h) 2,3-Enoylhydratase	85
i) Malonyltransferase	85
j) Acetyltransferase	87
k) Acetyltransferase, optische Bestimmungsmethode	88
l) Hemmung der FSS mit N-Äthylmaleinimid	88
7. Zu Abschnitt C	88
a) Spaltung und Rekonstitution der FSS	88
b) Reaktionsordnung	88
c) Präparative Diskelektrophorese	89
E. Zusammenfassung	90
F. Literaturverzeichnis	91
Lebenslauf	

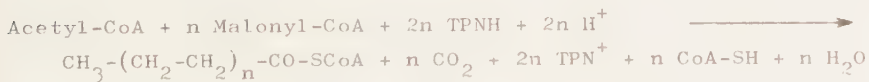
Verwendete Abkürzungen

FSS	Fettsäuresynthetase
CoA, CoA-SH	Coenzym A
Pant, Pant-SH	Pantethein
Ac, Mal	Acetyl, Malonyl
DPN	Nicotinamidadenindinucleotid
DPNH	Nicotinamidadenindinucleotid, reduziert
TPN	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
TPNH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
FMN	Flavinmononucleotid
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
NÄM	N-Äthylmaleinimid
DTNB	5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure
PM-SI	Phenylmethansulfonylfluorid
TAL	Triacetsäurelaktone
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
KPO ₄	Kaliumphosphatpuffer
DO ₂ CO	1,4-Bis-2-(5-phenyloxazol)-benzol
PPD	2,5-Diphenyloxazol
U _{PM}	Umdrehungen pro Minute
ipM	Impulse pro Minute
E. ml.	Extinktion, Einheit, Millicinheit
ΔE	Extinktionsänderung
T	Temperatur, Transmission
μ	mikro
UV	Ultraviolett
min	Minute
K	Dissoziationskonstante
K _M	Michaeliskonstante

A. Einleitung

Erste grundlegende Prinzipien im Fettsäurestoffwechsel wurden zu Beginn dieses Jahrhunderts von KNOOP erkannt. Seine Untersuchungen zum Fettsäureabbau führten zum Postulat der β -Oxidation, welches besagt, daß die Verkürzung der Fettsäurekette schrittweise um eine C_2 -Einheit erfolgt (1). Bei der Aufklärung des Abbauweges im LYNENSchen Laboratorium konnte diese C_2 -Einheit als die "aktivierte Essigsäure", das Acetyl-Coenzym A, identifiziert werden (2). Der Aufbau der langkettigen Fettsäuren erfolgt ebenfalls aus Essigsäureeinheiten (3,4), wird jedoch nicht durch die bloße Umkehr der Reaktionsfolge des Fettsäureabbaus vollzogen. Beim Studium der de-novo-Fettsäuresynthese stellte sich heraus, daß der Kettenaufbau unter Beteiligung von Malonyl-Coenzym A abläuft (5-7). Acetyl-Coenzym A wird zunächst enzymatisch zu Malonyl-Coenzym A carboxyliert. Die Synthese der gesättigten Fettsäuren erfolgt dann durch das Enzym Fettsäuresynthetase, indem C_2 -Einheiten aus Malonyl-Coenzym A wiederholt an einen Essigsäurerest aus Acetyl-Coenzym A angelagert werden. Während die Bauelemente verknüpft werden, wird das im Primärschritt, in der Carboxylierungsreaktion, eingebaute Kohlendioxid wieder abgespalten, wodurch die Entstehung der Fettsäurederivate thermodynamisch begünstigt wird.

Beim Studium der Fettsäuresynthetase aus Hefe, welche die Synthese von Palmityl- und Stearyl-Coenzym A ($n = 7,8$) gemäß Bilanzgleichung (Gl. 1) katalysiert, konnte LYNEN die chemischen Einzelheiten des Reaktionsprozesses ableiten (8-10). Die Grundsätze des Reaktionsablaufs haben für zahlreiche Fettsäuresynthetasen, die inzwischen aus anderen Organismen angereichert werden konnten, Gültigkeit erlangt (Übersicht in 11-13).



Gl. 1

Fettsäuresynthetase aus Hefe ist Bestandteil des cytoplasmatischen Raumes (14, 15). Das Enzym kann in reiner Form isoliert werden und verhält sich im Schwerfeld als einheitliches Protein vom Molekulargewicht $2,3 \cdot 10^6$ Dalton.

Die Synthese der Fettsäuren verläuft in mehreren Teilschritten. Die dafür erforderlichen Enzyme sind zu einem stabilen Multienzymkomplex zusammengefügt. Durch diese Koordination der Teilenzyme wird eine wirksame Kontrolle des Syntheseablaufs ermöglicht. Alle auftretenden Zwischenstufen sind kovalent am Enzym gebunden. Für die Ausbildung dieser Bindungen sind zwei verschiedene SH-Gruppen von besonderer Bedeutung.

Die von LYNEN als "zentrale SH-Gruppe" bezeichnete, konnte als Thiolgruppe eines enzymgebundenen 4'-Phosphopantetheinrestes identifiziert werden (16,17). Die Zwischenprodukte bleiben dort während der enzymatischen Synthese als Thioester gebunden, während sie den verschiedenen enzymatischen Wirkzentren des Multienzymkomplexes zugeführt werden. Der zentralen SH-Gruppe wird in diesem Sinne die Funktion eines beweglichen Substratcarriers zugeschrieben (16,18). Ein Mol Fettsäuresynthetase enthält mindestens 5 Mole 4'-Phosphopantethein (19,20).

Die zweite Art von SH-Gruppen, von LYNEN "periphere" benannt, sind Bestandteile von Cysteinresten, welche im aktiven Zentrum des Kondensierenden Teilenzymes fixiert sind (21,22).

Die Übertragung der Acetyl- und Malonylreste von Coenzym A auf den am Enzym verankerten Substratträger wird durch Proteinkomponenten des Komplexes ausgeführt, deren funktionelle Zentren zunächst als X- und Y-Gruppen bezeichnet wurden, und die wegen ihres chemischen Verhaltens keine Mercaptane sein können (23,24).

Die Acceptorgruppe des essigsäureübertragenden Teilenzymes, die Y-Gruppe, konnte von ZIEGLER (15,26,27) als Hydroxylrest identifiziert werden, nachdem er ein serinhaltiges Acetylpeptid isoliert hatte, in dem der Acetatrest mit der Serinhydroxylgruppe verestert war. Zur Bestimmung der X-Gruppe untersuchte SCHWEIZER die entsprechenden Malonylpeptide. Sie waren von anderer Zusammensetzung, wahrscheinlich ist aber auch hier eine Serinhydroxylgruppe Acceptor des Malonates (17).

START REAKTION (Acetyl-Transfer)



REAKTIONEN DER KETTENVERLÄNGERUNG:

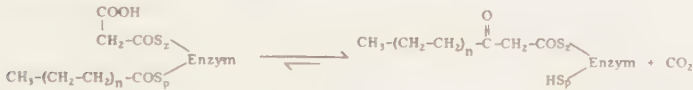
1) Acyl-Transfer:



2) Malonyl-Transfer:



3) Kondensation:



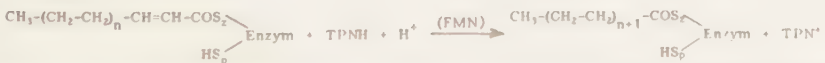
4) 1. Reduktion:



5) Dehydratation:



6) 2. Reduktion:



ABSCHLUSS-REAKTION (Palmityl-Transfer):



Die chemischen Reaktionen der Fettsäuresynthese nach LYNEN (8, 10).

$-\text{HS}_z$ = zentrale SH-Gruppe, $-\text{HS}_p$ = periphere SH-Gruppe

Die einzelnen Schritte der Fettsäuresynthese sind auf S. 3 zusammengefaßt. Die Synthese beginnt mit der Übertragung des Acetylrestes von Acetyl-CoA durch die Acetyl-Transferase (Y-Gruppe) über die zentrale zur peripheren SH-Gruppe. Dieser Acetylrest kondensiert dann mit einem durch die Malonyl-Transferase (X-Gruppe) auf die zentrale SH-Gruppe übertragenen Malonylrest unter Kohlendioxidabspaltung zum Acetoacetylrest. Diese Kondensation läuft wahrscheinlich nach einem konzertierten Mechanismus ab (29). Der Acetoacetylrest bleibt jetzt als Thioester am 4'-Phosphopantethein, der zentralen SH-Gruppe, gebunden und wird im folgenden Reaktionsablauf mit verschiedenen aktiven Zentren des Multienzymkomplexes in Kontakt gebracht. Zunächst wird er in einem Reduktionsschritt zum 3-Hydroxybutyryl-Rest umgewandelt, wobei TPNH Coenzym ist. Nach Dehydratisierung zum Crotonyl- und anschließender Reduktion mit FMNH₂ als Coenzym zum Butyrylrest ist der erste Cyclus der Synthese beendet. Der Butyrylrest wird nunmehr auf die periphere SH-Gruppe übertragen. Nachdem wieder ein Malonylrest auf die zentrale SH-Gruppe transferiert worden ist, wird dieser in einem erneuten Reaktionscyclus mit dem Butyrylrest verlängert. Nach insgesamt sieben oder acht solcher Reaktionscyclen ist ein Palmityl- oder Stearylrest entstanden, der dann auf Coenzym A rückübertragen wird. Die Transferase, welche diese Übertragung katalysiert, ist in ihrer Aminosäurezusammensetzung identisch mit der Malonyltransferase (28).

Die Auflösung der Bilanzreaktion (Gl. 1) in diese Teilschritte gelang LYNEN, indem er einerseits den Einfluß von Schwefelgiften auf die SH-Gruppen untersuchte und andererseits enzymgebundene Zwischenstufen isolierte und charakterisierte. Einen wesentlichen Anteil an der Aufklärung der durch den Multienzymkomplex katalysierten Teilschritte hatten aber auch Untersuchungen mit Substratmodellen, mit denen die enzymatischen Teilaktivitäten unabhängig voneinander nachgewiesen werden konnten (8,9). Zur Bestimmung der Teilaktivitäten des Multienzymkomplexes setzt man an die Stelle der natürlichen Acylzwischenstufen, die am enzymgebundenen 4'-Phosphopantethein fixiert sind, die entsprechenden

niedermolekularen Substratmodelle. Das sind Thioester, deren Mercaptankomponenten ähnlich aufgebaut sind wie 4'-Phosphopantethein. Meistens werden die S-Acylpantethein- oder die S-Acyl-N-Acetyl-cysteaminverbindungen verwendet.

Die Modellverbindungen lagern sich, ohne kovalent mit dem Enzym verbunden zu werden, an die korrespondierenden Wirkzentren des Enzymkomplexes und werden dort enzymatisch umgesetzt. Die Teilenzyme, welche die Kondensation, die erste Reduktion, die Dehydratase und die zweite Reduktion katalysieren, können so unabhängig voneinander vermessen werden, wenn 3-Ketoacyl-, 3-Hydroxyacyl-, oder 2,3-Enoyl-Thioester verwendet werden. (Vgl. S. 3)

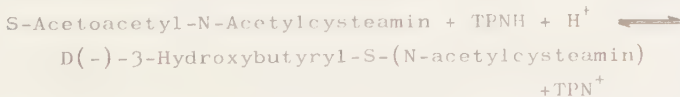
In ähnlicher Weise werden die Acyltransferasen charakterisiert. Sie übertragen den Acylrest auf radioaktiv markiertes Coenzym A oder auf Pantethein, welche an Stelle des natürlichen enzymgebundenen 4'-Phosphopantetheins stehen (8, 30).

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Teilaktivitäten des in Untereinheiten gespaltenen Multienzymkomplexes. Zuerst werden die mit den Substratmodellen feststellbaren Teilenzyme des nativen Enzymkomplexes beschrieben.

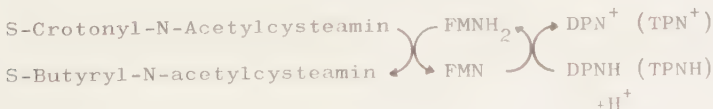
B. Die Teilreaktionen der Fettsäuresynthetase

I. Die reduzierenden Komponenten des Multienzymkomplexes.

Die Enzymkomponenten, die die beiden Reduktionsschritte in der Fettsäuresynthese katalysieren, werden durch die in Gleichung 2 und 3 wiedergegebenen Modellreaktionen beschrieben (8,25).



Gl. 2: 1. Reduktion, 3-Ketoacylreduktase



Gl. 3: 2. Reduktion, 2,3-Enoylreduktase, 2,3-Dehydroacylreduktase

Als Modells substrat für die Kennzeichnung der 3-Ketoacylreduktase dient S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin. Die Bestimmung der 2,3-Enoylreduktase wird mit S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin durchgeführt. Meßgröße ist die Geschwindigkeit, mit der diese Verbindungen reduziert werden.

1. Spezifität verschiedener Modellthioester

Wird die N-Acetylcysteaminkomponente der Modellverbindungen durch andere Mercaptane ersetzt, dann ändern sich die Reaktionskonstanten der Modellreaktion in unterschiedlichem Ausmaß. In Abb. 1 - 6 sind Substratabhängigkeiten verschiedener Thioester aufgezeichnet. Die Auswertungen nach LINEWEAVER und BURK (31) ergaben die in Tab. 1 zusammengefassten Werte.

Die Michaeliskonstanten erfahren keine wesentlichen Änderungen, wenn statt der N-Acetylcysteamin- die N-Succinylcysteaminderivate*) verwendet werden. Die Affinität zur 2,3-Enoylreduktase wird aber zehnmal kleiner, wenn die das Strukturelement Cysteamin nicht mehr enthaltende S-Crotonyl-Thioglykolsäure eingesetzt wird. Die Maximalgeschwindigkeit (V_{Max}) der 2,3-Enoylreduktase nimmt - verglichen mit dem N-Acetylderivat - um ca. 75% ab, wenn S-Crotonyl-N-Succinylcysteamin oder S-Crotonyl-Thioglykolsäure verwendet wird. Möglicherweise bewirkt die Carbonsäuregruppe der beiden Modells substrate, daß durch eine ungenaue Fixierung an den wirksamen Elementen dieses Teilenzymes die Umsatzzahl verringert wird. Längerkettige Acylderivate werden von der 2,3-Enoylreduktase rascher umgesetzt. Beim Ersatz von S-Crotonyl-N-Succinylcysteamin durch 2,3-Octenoyl-S-(N-Succinylcysteamin) steigt die Geschwindigkeit um etwa das zwanzigfache an, während der Wert der Michaeliskonstanten keine auffallende Änderung erfährt.

*) Die in den Mercaptankomponenten abgeänderten Modellverbindungen waren von EGGERER im Münchner Laboratorium synthetisiert worden. Obwohl die Präparate bereits mehr als 15 Jahre alt waren, konnten sie ohne Nachreinigung eingesetzt werden, da die Schmelzpunkte und die Merkmale der UV-Spektren mit den in (32) angegebenen Daten übereinstimmten.

		K_M (mM)	V_{Max} ($\frac{mE}{mg}$)	TPNH (μM)
3-Ketoacylreduktase	S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin	40	17000	200
	S-Acetoacetyl-N-Succinylcysteamin	40	17000	
2,3-Enoylreduktase	S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin	5	10	300
	S-Crotonyl-Thioglykolsäure	40	2,5	
	2,3-Octenoyl-S-(N-Succinylcysteamin)	3	50	

Tab. 1

Thioesterabhängigkeit in den Modellreaktionen der ersten und zweiten Reduktion. (Zusammenfassung der Abbildungen 1 - 6)
FSS-Aktivität: 1450 mE/mg

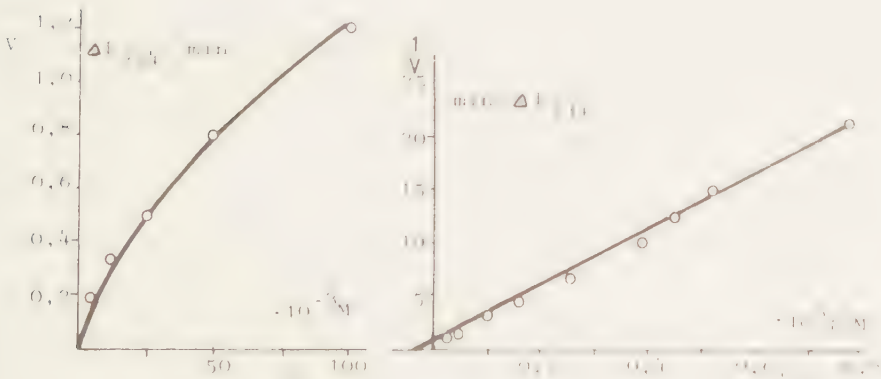


Abb. 1: S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin-Abhängigkeit der 3-Ketoacylreduktase. Auswertung nach (31).
(Ausführung s. S. 83)

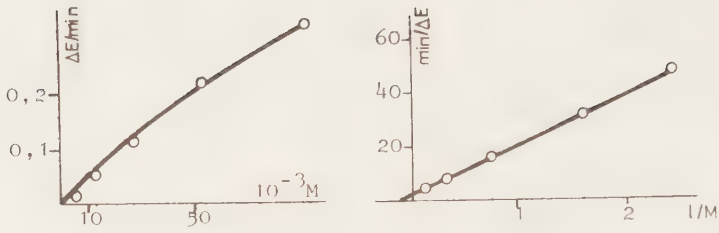


Abb. 2: S-Acetoacetyl-N-Succinylcysteamine-Abhängigkeit der 3-Ketoacylreduktase. Auswertung nach (31).
(Ausführung s. S. 83)

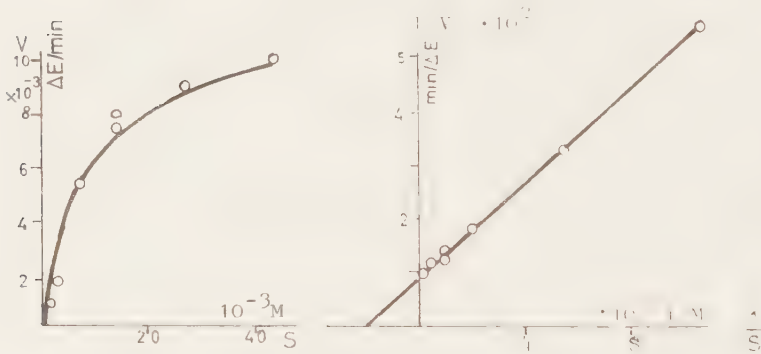


Abb. 3: S-Crotonyl-N-Acetylcysteamine-Abhängigkeit der Enoylreduktase. Auswertung nach (31).
(Ausführung s. S. 83)

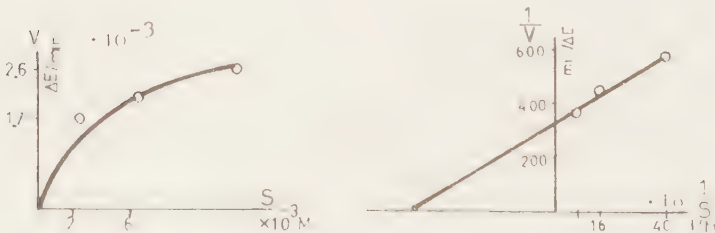


Abb. 4: S-Crotonyl-N-Succinylcysteamine-Abhängigkeit der Enoylreduktase. Auswertung nach (31).
(Ausführung s. S. 83)

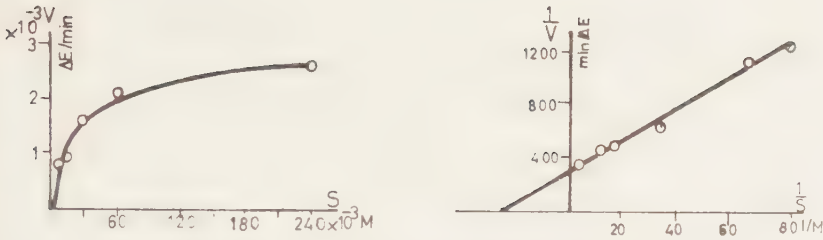


Abb. 5: S-Crotonyl-Thioglykolsäure-Abhängigkeit der Enoylreduktase. Auswertung nach (31).
Ausführung s. S.83

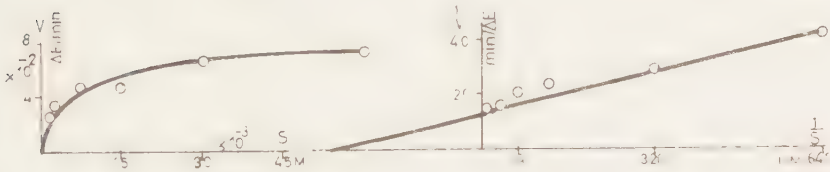


Abb. 6: 2,3-Octenoyl-S-(N-Succinylcysteamine)-Abhängigkeit der Enoylreduktase. Auswertung nach (31).
Ausführung s. S.83

2. Pyridinnukleotidspezifität

Die Abhängigkeit der Fettsäuresyntheseaktivität von der TPNH- und der DPNH-Konzentration ist in Abb. 7 wiedergegeben. Für beide Substrate wird die Maximalgeschwindigkeit $V_{\text{Max}} \approx 2500 \text{ mE}/\text{mg}$ extrapoliert.

Die Michaeliskonstanten betragen $K_M (\text{TPNH}) = 5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (Lit. 46: $6,7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$), $K_M (\text{DPNH}) = 1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

DPNH muß also in wesentlich höheren Konzentrationen eingesetzt werden, wenn die gleiche Umsatzgeschwindigkeit erreicht werden soll wie mit TPNH.

Die Abhängigkeit der 3-Ketoacylreduktase-Aktivität von der Konzentration der reduzierten Cofermente ist in Abb. 8 aufgezeichnet.

Die Michaeliskonstanten liegen in der gleichen Größenordnung wie bei der Gesamtreaktion.

K_M (TPNH) = $2 \cdot 10^{-5} M$ V_{MAX} = 6900 mE/mg (15mM S-Acetoacetyl-
 K_M (DPNH) = $5 \cdot 10^{-4} M$ V_{MAX} = 830 mE/mg N-Acetylcysteamin)

Abb. 7: Substratabhängigkeit von
 TPNH (●—●) und DPNH (○—○)
 im Aktivitätstest der Ge-
 samtreaktion. Reziproke Auf-
 tragung der Meßwerte nach (31).
 (Ausführung s. S. 83)
 FSS-Aktivität 1850 mE/mg

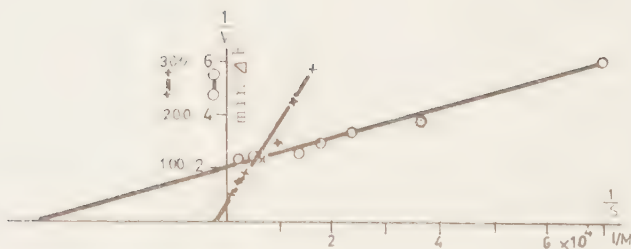
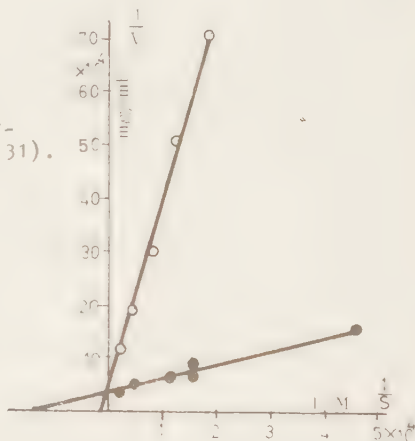


Abb. 8: Substratabhängigkeit von TPNH (○—○) und
 DPNH (x—x) im Aktivitätstest der
 1. Reduktion.
 Reziproke Auftragung der Meßwerte nach (31).
 (Ausführung s. S. 83)
 15 mM S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin
 FSS-Aktivität 1850 mE/mg

Das Substratmodell verhält sich gegenüber den im Fettsäuresynthesecyclus auftretenden Ketoacyl-Zwischenprodukten allerdings nicht völlig analog, denn die mit DPNH in der Modellreaktion erreichbare Maximalaktivität ist nur etwa ein zehntel so groß wie mit TPNH.

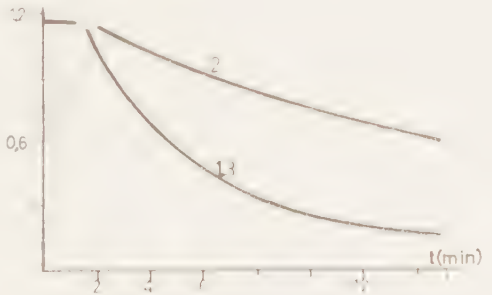
Die Abhängigkeiten der Modellreaktion der Enoylreduktase von den Pyridinnukleotiden sind in Tab. 2 dargestellt.

TPNH-Konzentration ($\cdot 10^{-4}$ M)	2,04	1,36	0,68
spezifische Aktivität (mE/mg)	2,5	1,8	1,55
DPNH-Konzentration ($\cdot 10^{-4}$ M)	2,27	1,13	0,4
spezifische Aktivität (mE/mg)	2,8	3,0	2,8

Tab. 2: Aktivität der Enoylreduktase bei verschiedenen TPNH- und DPNH-Konzentrationen. (Ausführung s. S.83)
 15 mM S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin
 FSS-Aktivität 1850 mE/mg

DPNH kann demnach TPNH ersetzen und wird in kleineren Konzentrationen schneller umgesetzt als TPNH.
 Die Messungen wurden unter aeroben Bedingungen durchgeführt.
 Eine genauere Festlegung der Parameter war deshalb nicht möglich, weil die hier nötigen hohen Enzymkonzentrationen eine beträchtliche Oxidation der Reduktionsmittel durch Luftsauerstoff bewirken.

Abb. 2: Pyridinnukleotidverbrauch in der Gesamtreaktion, Reaktionsverlauf. Durchführung s.S.83
 Kurve 1:
 0,11 μ Mol TPNH
 Kurve 2:
 0,11 μ Mol DPNH
 Kurve 3:
 0,055 μ Mol TPNH
 und 0,055 μ Mol DPNH eingesetzt.



Messungen zum Ablauf der Gesamtreaktion sind in Abb. 9 dargestellt. Die Pyridinnukleotide sind hier, verglichen mit den übrigen Substraten, im Unterschluß eingesetzt worden.

TPNH wird in der Gesamtreaktion rasch und vollständig verbraucht (Kurve 1). DPNH wird unter diesen Reaktionsbedingungen wesentlich langsamer umgesetzt (Kurve 2). Dies war zu erwarten, denn in der Modellreaktion der Enoylreduktase konnte TPNH zwar durch DPNH ersetzt werden (Tab. 6), die 3-Ketoacylreduktase erwies sich jedoch als spezifisch für TPNH (Abb. 8).

Setzt man beide Cofermente im Verhältnis 1:1 zusammen in der Gesamtreaktion ein, dann werden sie allerdings ebenso rasch und vollständig verbraucht wie TPNH alleine (Kurve 3). Unter diesen Reaktionsbedingungen wird also offenbar TPNH von der 3-Ketoacyl- und DPNH von der Enoylreduktase umgesetzt. Außerdem ist denkbar, daß der DPNH-Verbrauch durch eine Transhydrogenierung entsprechend Gl. 4 verursacht wird.



Gl. 4

Das während der Fettsäuresynthese entstehende TPN^+ könnte dann nämlich mit DPNH wieder reduziert werden, wenn die Fettsäuresynthetase die Eigenschaften einer Transhydrogenase besitzt.

Die Transhydrogenierung zwischen den beiden Pyridinnukleotiden TPN^+ und DPNH wird von Fettsäuresynthetase jedoch nicht katalysiert. Nach Inkubation von Fettsäuresynthetase mit TPN^+ und DPNH war kein DPN^+ nachweisbar. (exp. Teil. S. 84)

Da die Kinetik des TPNH-Verbrauchs in Kurve 1 mit der Kinetik der Kurve 3 deckungsgleich ist, erscheint die Annahme berechtigt, daß die Enoylreduktase DPNH bevorzugt verbraucht, wenn beide Substrate angeboten werden. Die Michaeliskonstante für DPNH in der Teilaktivität der zweiten Reduktion sollte also kleiner sein, als für TPNH.

Eine Substratabhängigkeit, bei der beide Pyridinnukleotide zusammen in der Gesamtreaktion eingesetzt wurden, ist in Abb. 10 wiedergegeben, das molare Verhältnis von DPNH und TPNH war konstant 1 : 1.

Die Synthesegeschwindigkeit ist hier also dann durch die Reaktion des TPNH mit der 3-Ketoacylreduktase bestimmt. Die Michaelis-konstante des TPNH wurde bei dieser Messung zu $K_M(\text{TPNH}) = 1 \cdot 10^{-5} \text{M}$ ermittelt, und kann also auf die Wirkung der 3-Ketoacylreduktase-aktivität während der Fettsäuresynthese bezogen werden. Außerdem folgt aus diesem Experiment, daß die Zugabe von DPNH keine Erhöhung der spezifischen Aktivität zur Folge hat. Sowohl mit TPNH als auch mit DPNH und TPNH zusammen wird eine Maximalgeschwindigkeit von $V_{\text{Max}} = 2800 \text{ mE/mg}$ ermittelt.

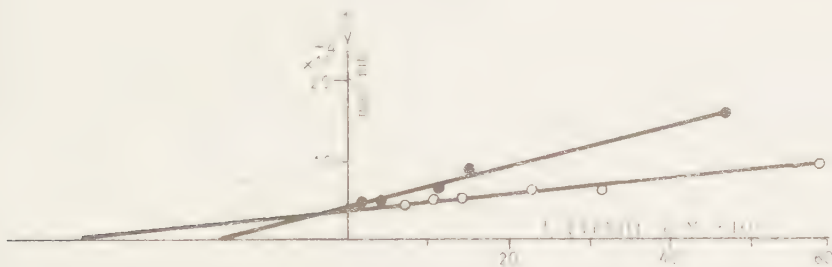


Abb. 10: Substratabhängigkeit von TPNH (●-●-●-) und TPNH/DPNH (Molverhältnis 1 : 1,1) (o-o-o-o) in der Gesamtreaktion. Durchführung s. S. 83

Der Zusatz von DPNH führt außerdem zu einer geringfügigen Erniedrigung der Michaeliskonstante für TPNH in der 3-Ketoacylreduktion, denn in der Modellreaktion beträgt die Konstante $K_M = 2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (Abb. 8). Diese synergistische Wirkung des DPNH am Hefeenzym wurde auch von WHITE, III, MITSUHASHI und BLOCH (35) festgestellt, deren Messungen zeigen, daß der K_M -Wert des TPNH in der Gesamtreaktion um den Faktor ca. 3 - 5 abnimmt, wenn das Enzym weitgehend mit DPNH gesättigt ist.

In entsprechender Weise finden die Autoren eine wesentliche Abnahme des K_M -Wertes von DPNH, wenn das Enzym mit TPNH gesättigt ist. Aus unseren Meßergebnissen müssen wir allerdings schließen, daß die Michaeliskonstante für DPNH nicht bestimmt werden kann, wenn das Enzym mit TPNH gesättigt ist, da keine Zunahme der Umsatzgeschwindigkeit eintritt, wenn zusätzlich DPNH zugesetzt wird.

Wird die Pyridinnukleotidabhängigkeit der Gesamtreaktion ohne DPNH-Zusatz gemessen, wird also nur TPNH eingesetzt (Abb. 7 u. 10), dann ist der K_M -Wert fünfmal größer. Er beträgt K_M (TPNH) = $5 \cdot 10^{-5}$. In diesem Falle hängt die Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit also vom Teilenzym 2,3-Enoylreduktase ab, und die Michaeliskonstante kann auf das Zusammenspiel zwischen TPNH und Enoylreduktase beim Ablauf der Gesamtreaktion bezogen werden.

In Tab. 3 sind die Ergebnisse der Messungen zur Pyridinnukleotidspezifität zusammengefaßt.

		K_M (M)		V_{Max} mE/mg
3-Keto-acylreduktase	(Modellreaktion)	TPNH (S) $\left(\frac{x}{x} \right)$	$2 \cdot 10^{-5}$	6900
		DPNH (S) $\left(\frac{x}{x} \right)$	$5 \cdot 10^{-4}$	830
	(Gesamtreaktion)	TPNH (S)	$1 \cdot 10^{-5}$	2500
2,3-Enoylreduktase	(Modellreaktion)	DPNH (S)	$\leftarrow K_M$ (TPNH)	n.b.
		TPNH (S)	$\rightarrow K_M$ (DPNH)	n.b.
	(Gesamtreaktion)	DPNH (+TPNH) (R)	$\leftarrow K_M$ (TPNH)	
		TPNH (S)	$5 \cdot 10^{-5}$	2500
Gesamtreaktion		TPNH (S)	$5 \cdot 10^{-5}$	2500
		DPNH (S)	$1 \cdot 10^{-3}$	2500

Tab. 3: Pyridinnukleotidbedarf der Fettsäuresynthetase.
S = Substratabhängigkeit, R = Reaktionsverlauf, n.b. = nicht bestimmt, $\frac{x}{x}$ 15 mM S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin.

3. Zur Reversibilität der Modellreaktionen

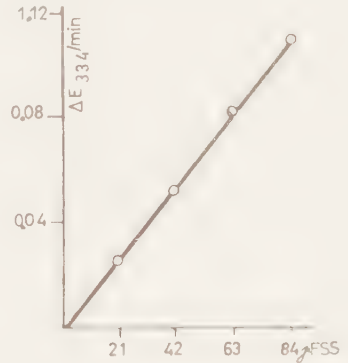
Alle Teilschritte des Fettsäuresynthesecyclus sind reversible Reaktionen (24,49,48). Lediglich der letzte Umwandlungsschritt der Reaktionsfolge, nämlich die Reduktion des Enoylderivates zum gesättigten Acylrest, verläuft praktisch irreversibel, und ist dafür verantwortlich, daß sowohl der Fettsäureaufbau aus Malonyl-CoA als auch die durch das mitochondriale System katalysierte Synthese aus Acetyl-CoA (50) thermodynamisch stark begünstigt ist.

Aus den Standard-Reduktionspotentialen ($E_o(\text{Crotonyl-CoA/Butyryl-CoA}) = -0,015 \text{ V}$ (39), $E_o(\text{NAD}^+/\text{NADH}) = 0,32 \text{ V}$ (40)) folgt für die Gleichgewichtskonstante, berechnet nach 41:

$$K = \frac{(\text{Butyryl-CoA}) (\text{DPN}^+)}{(\text{Crotonyl-CoA}) (\text{DPNH}) (\text{H}^+)} = 4,5 \cdot 10^{10} \quad (41)$$

Die Teilaktivität der Fettsäuresynthetase für die Rückreaktion des reversiblen ersten Reduktionsschrittes bestimmten wir, indem wir D-(-)-3-Hydroxy-S-(N-Acetylcysteamin) (der Multienzymkomplex ist nur für diese Antipode spezifisch) als Ausgangsverbindung verwendeten. Das Substrat war enzymatisch mit dem hydratisierenden Teilenzym dargestellt worden (vgl. Kap. III). Eine Enzymabhängigkeit der Reaktion ist in Abb. 11 wiedergegeben.

Abb. 11: 3-Hydroxyacyldehydrogenase, Enzymabhängigkeit. Durchführung S. 83



4. Die kinetisch definierten Reaktionskonstanten der 3-Ketoacylreduktion.

Gleichung 5 beschreibt die Abhängigkeit der Geschwindigkeit v von den Konzentrationen (A) und (B) der Substrate A und B für ein Enzymsystem mit zwei Substraten. V_1 ist die theoretisch erreichbare Maximalgeschwindigkeit, wenn das Enzym mit beiden Substraten gesättigt ist. K_A und K_B sind die kinetisch definierten Michaelis-konstanten, also Funktionen der individuellen Geschwindigkeits-

konstanten, und K'_A ist die Dissoziationskonstante des Substrat-Enzymkomplexes EA. Die reziproke Form der Gl. 5 ist durch Gl. 6 gegeben.

$$v = \frac{v_1(A)(B)}{(A)(B) + K_A(B) + K_B(A) + K'_AK_B}$$

Gl. 5

$$\frac{1}{v} = \left(1 + \frac{K_A}{(A)} + \frac{K_B}{(B)} + \frac{K'_AK_B}{(A)(B)}\right) / v_1$$

Gl. 6

Die Auftragung der reziproken spezifischen Aktivitäten der 3-Ketoacylreduktase gegen die entsprechenden reziproken Thioesterkonzentrationen bei verschiedenen konstanten TPNH-Konzentrationen führte zu dem Lineweaver-Burk-Diagramm der Abb. 13. In Abb. 12 sind in entsprechender Weise die reziproken TPNH-Konzentrationen bei konstantem Thioesterzusatz aufgetragen. Ein besonderes Merkmal der beiden Lineweaver-Burk-Diagramme ist, daß der Schnittpunkt der Geraden auf der Abszisse liegt, ein Vergleich mit Gl. 6 zeigt, daß $K_A = K'_A$. Die Michaeliskonstante K_A ist also mit der Dissoziationskonstante K'_A identisch. Die Geschwindigkeit, mit der der Enzym-Substrat-Komplex in die Produkte umgewandelt wird, ist also so klein, daß das Gleichgewicht zwischen Substrat und Enzym-Substrat-Komplex nicht gestört wird. Hier sind offenbar ähnliche Voraussetzungen gegeben, wie sie MICHAELIS und MENTEN bei der Ableitung der Gleichung für Enzymreaktionen mit einem Substrat annahmen (33).

Die kinetisch definierte Michaeliskonstante für TPNH wird zu $K_{\text{TPNH}} = 2 \cdot 10^{-5} \text{M}$ (Abb. 12) und für S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin zu $K_{\text{S-AcAc}} = 3 \cdot 10^{-2} \text{M}$ (Abb. 13) ermittelt.

Nach (44) wird die Maximalgeschwindigkeit, die sich ergibt, wenn das Enzym mit beiden Substraten gesättigt ist, zu $v_1 = 20,8 \text{ E/mg}$ bestimmt (Abb. 14).

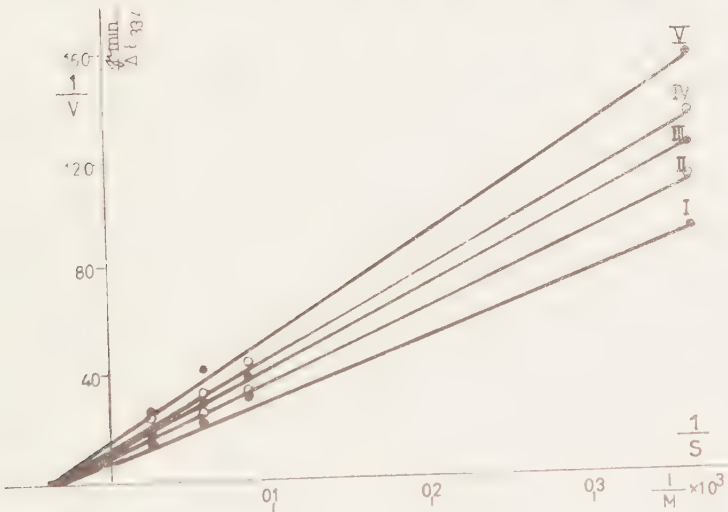
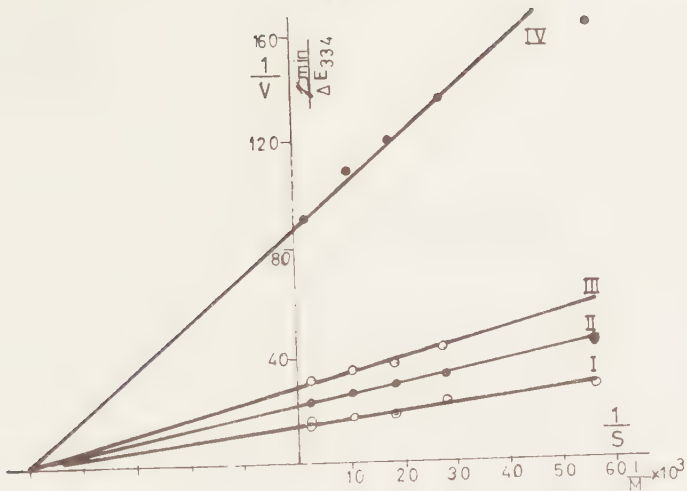


Abb. 12: (oben)

3-Ketoacylreduktase. Lineweaver-Burk-Diagramm der Substratabhängigkeit. Auftragung der reziproken spezifischen Aktivität gegen die reziproken TPNH-Konzentrationen bei vier verschiedenen konstanten S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin-Konzentrationen: (I) 40 mM, (II) 17,2 mM, (III) 11,5 mM, (IV) 2,86 mM

Abb. 13: (unten)

wie Abb. 12, jedoch Auftragung der reziproken spezifischen Aktivität gegen die reziproken S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin-Konzentrationen bei fünf verschiedenen konstanten TPNH-Konzentrationen: 272 μ M (I), 90,5 μ M (II), 54,3 μ M (III), 36,2 μ M (IV), 18,1 μ M (V). Fettsäuresynthetase-Aktivität: 1650 mE/mg Durchführung s. S.83

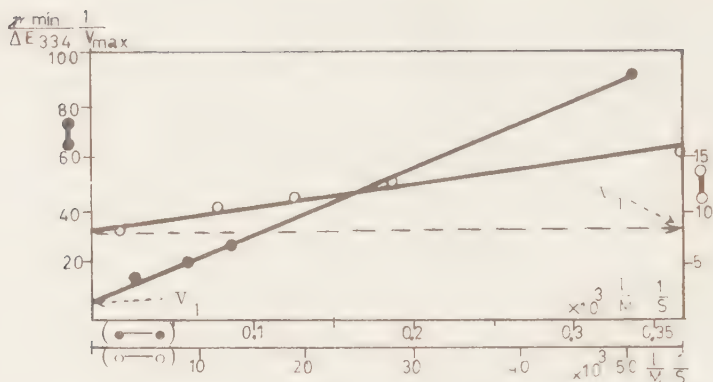


Abb. 14: Graphische Bestimmung der Maximalgeschwindigkeit V_1 der 3-Ketoacylreduktase.

(●-●-): Auftragung der reziproken V_{Max} -Werte aus Abb. 12 gegen die reziproken Thioesterkonzentrationen.

(○-○-): Auftragung der reziproken V_{Max} -Werte aus Abb. 13 gegen die reziproken TPNH-Konzentrationen.

Der spezielle Fall, daß die kinetisch definierten Michaelis-konstanten mit den Dissoziationskonstanten der Enzym-Substrat-Komplexe identisch sind, kann bedeuten, daß die beiden Substrate in zufälliger Reihenfolge am Enzym gebunden werden und mit den Enzym-Substrat-Komplexen in einem raschen Dissoziations-Assoziations-Gleichgewicht stehen, während die Umwandlung des ternären TPNH-3-Ketoacyl-Enzymkomplexes in die Produkte der einzige langsame Schritt in der Reaktionsfolge ist. ("Rapid Equilibrium Random bi bi" -Mechanismus, (52)).

Ein solcher Mechanismus wird für Hexokinase aus Hefe (53) und Pyruvatkinase (54) diskutiert. Neuere rechnerische Ansätze (z.B. 55,58) haben allerdings gezeigt, daß auch andere Mechanismen mit dem Bild der Lineweaver-Burk-Diagramme (Abb. 12 u. 13) in Einklang zu bringen sind. Der Mechanismus dieser Modellreaktion kann also erst dann endgültig geklärt werden, wenn unabhängige kinetische Messungen durchgeführt werden.

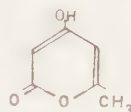
II. Kondensation

Das Kondensierende Teilenzym der Fettsäuresynthetase katalysiert die Kettenverlängerung unter Decarboxylierung. Diese katalytische Funktion kann vermessen werden, wenn die Reaktion des enzymgebundenen Acetoacetylrestes bei Abwesenheit von TPNH verfolgt wird. Acetoacetylzym wird dann zum Teil zu freier Acetessigsäure hydrolysiert, zum Teil kondensiert es mit einem weiteren Malonylrest zum Triacetsäurederivat. Unter Rückbildung des Enzymes wird schließlich Triacetsäurelacton freigesetzt (Gl. 7) (45,47).

Acetylpanthethin

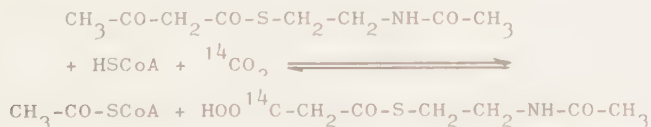


Gl. 7



Triacetsäurelacton besitzt ein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 278 mμ, das wir für einen optischen Test nutzten. Statt der Coenzym A-Verbindungen, deren Eigenextinktionen den Test gestört hätten, verwendeten wir die Substrate Acetyl- und Malonylpanthethin. Die Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit und von der Enzymkonzentration zeigt Abb. 15.

Eine andere Möglichkeit, das Kondensierende Teilenzym nachzuweisen, ist durch die in Gl. 8 beschriebene Modellreaktion, mit der die Rückreaktion der Kondensation (s. S.84) simuliert wird, gegeben.



Gl. 8. Kondensierendes Teilenzym, "Spaltung unter Carboxylierung".

Die enzymatische Spaltung des S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin durch C-14-Kohlendioxid wird nachgewiesen, indem man die im S-Malonyl-N-Acetylcysteamin inkorporierte Radioaktivität mißt (8,45,36). Die Zeitabhängigkeit der Reaktion ist in Abb. 16 wiedergegeben.

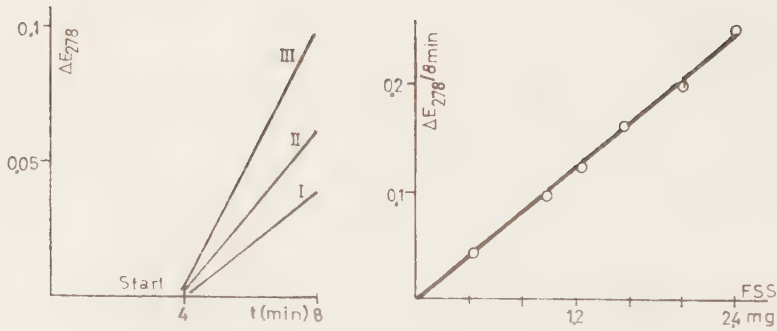


Abb. 15: Enzymatische Bildung von Triacetsäurelacton.
 Linkes Bild: Zeitabhängigkeit mit (I) 0,72, (II) 1,19 und (III) 2,06 mg FSS.
 Rechtes Bild: Enzymabhängigkeit
 Durchführung s. S. 84

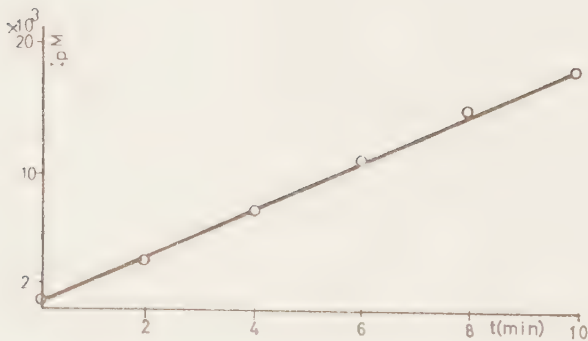
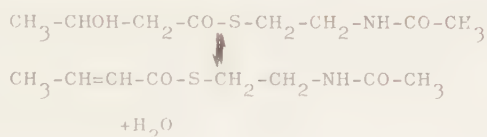


Abb. 16: Modellreaktion der Kondensation.
 Zeitabhängigkeit mit 620% FSS.
 Durchführung s. S. 84

III. 3-Hydroxyacyldehydratase und 2,3-Enoylhydratase

1) Dehydratase

Als Modellssubstrat für die Bestimmung der 3-Hydroxyacyldehydratase dient 3-Hydroxybutyryl-S-(N-Acetylcysteamin). Zur Aktivitätsbestimmung des Teilenzymes verfolgt man die Entstehung der ungesättigten Verbindung gemäß Gl. 9 (8,25). Meßgröße ist die charakteristische UV-Absorption des 2,3-ungesättigten Acylthioesters bei 263 m μ (43).



Die Substratabhängigkeit in Abb. 17 kennzeichnet die Fettsäuresynthetase als katalysierendes Enzym.

Aus der reziproken Auftragung der Werte ermittelt sich

$$K_M = 4 \cdot 10^{-2} / 2M = 2 \cdot 10^{-2} M \quad \text{und} \quad V_{\text{Max}} = 19 \text{ mE/mg}$$

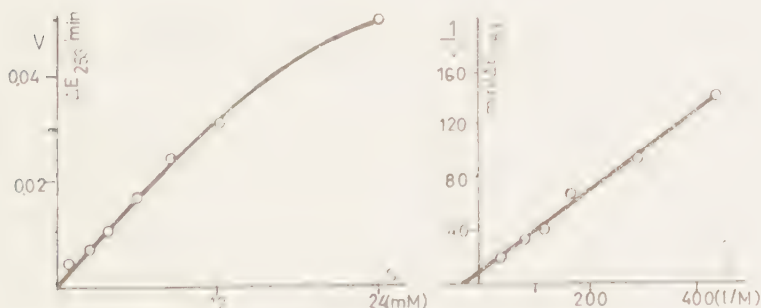


Abb. 17: 3-Hydroxyacyldehydratase, Substratabhängigkeit und Auswertung nach (31).
Durchführung s. S. 82
FSS-Aktivität: 1850 mE/mg.

Substrat des Teilenzymes ist nur die optisch aktive D-(-)-Antipode des Thioesters (8). Das von uns verwendete Modells substrat war jedoch das Razemat, da es auf organisch präparativem Wege dargestellt worden war. Wir berücksichtigten dies, indem wir die Michaeliskonstante halbierten. Dies kann selbstverständlich nur ein annäherndes Verfahren sein, da die andere Antipode die Reaktion kompetitiv hemmen könnte. Die von uns gemessenen Werte können also möglicherweise nur mit dem Razemat reproduziert werden.

2) Hydratase

Die Rückreaktion der in Gl. 9 wiedergegebenen Modellreaktion kann gemessen werden, indem die Abnahme der charakteristischen UV-Absorption verfolgt wird. Eine Substratabhängigkeit dieser Modellreaktion ist in Abb. 18 aufgezeichnet. Die kinetischen Konstanten sind $K_M = 1 \cdot 10^{-4} M$ und $V_{Max} = 11 \text{ mE/mg.}$

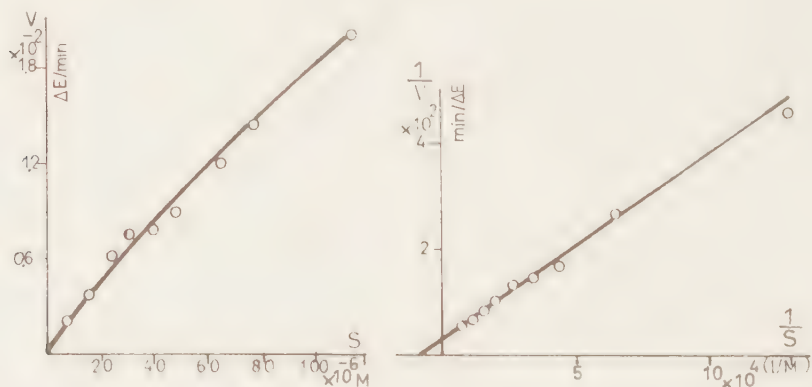


Abb. 18: 2,3-Enoylhydratase, Substratabhängigkeit und Auswertung nach (31)
Durchführung s. S.85
FSS-Aktivität: 1850 mE/mg.

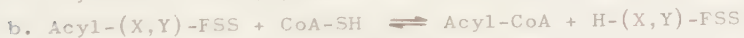
Die Abnahme der UV-Absorption könnte auch durch enzymatische Deacylierung des Thioesters zu Crotonsäure und Thiol verursacht werden. Dies ist jedoch nicht der Fall, denn das Produkt der

Modellreaktion verhielt sich im Dünnschichtchromatogramm wie authentisches 3-Hydroxybutyryl-N-Acetyl-cysteamin (vgl. S.75). Das von der Dünnschichtplatte eluierte Reaktionsprodukt konnte im Test der Rückreaktion der ersten Reduktion ungesetzt werden (vgl. S.15).

IV. Die Acyltransferasen

1. Vorbemerkungen

Die acylübertragenden Elemente der Fettsäuresynthese katalysieren den Transfer des Acylrestes von Acyl-Coenzym A auf die zentrale SH-Gruppe des Enzyms (s. S.2f). Die kinetische Charakterisierung des Transfers erfolgt durch Teilreaktionen, die entsprechend dem in Gl. 10 a,b,c angegebenen Schema verlaufen.



Gl. 10

Der Acylrest wird zunächst vom Acyl-Coenzym A auf das Serinhydroxyl der entsprechenden Transferase (X- oder Y-Gruppe) übertragen (Gl. 10a), dann erfolgt entweder der Transfer auf die zentrale SH-Gruppe oder die Rückübertragung auf Coenzym A, welche sich zu erkennen gibt, wenn radioaktiv markiertes Coenzym A im Testsystem eingesetzt wird (Gl. 10b) (SCHWEIZER et al, 56). Bei dieser Teilreaktion tritt also, im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Modellreaktionen, eine kovalente Acyl-Enzym-Zwischenverbindung auf. Zur Charakterisierung der Acyltransferasen bedienen wir uns der von HAGEN (21) beschriebenen Variante, bei der der radioaktiv markierte Acylrest von Acyl-Coenzym A gemäß Gleichung 10a und 10c auf Pantethein übertragen wird.

2. Malonyltransferase

a) Darstellung der Substrate. Gleichgewichtslage der Transferreaktion.

Die Synthese von C-14-Malonyl-CoA wird von EGGERER und LYNEN (60) beschrieben. S-C-14-Malonyl-N-Capryloylcysteamine, aus C-14-Malonsäure zubereitet, wird in einer Umesterungsreaktion zu C-14-Malonyl-CoA umgesetzt.

Eine modifizierte Vorschrift zur Erzielung hoher spezifischer Radioaktivitäten wird von SUMPER et al genannt (37), hohe Ausbeuten sind jedoch mit der ursprünglichen Anleitung von EGGERER und LYNEN erzielbar.

Die im experimentellen Teil auf S. 71 beschriebenen Abwandlungen ermöglichten es uns, ein hochmarkiertes Präparat in hoher Ausbeute darzustellen.

Pantethein wird durch alkalische Hydrolyse von S-Benzoylpantethein dargestellt (21,57). Die im experimentellen Teil beschriebenen Versuchsbedingungen führen zu einem Produkt, welches papierchromatographisch einheitlich ist (s.S. 76).

Die Aktivität der Malonyltransferase wird durch die Geschwindigkeit charakterisiert, mit der der isotope markierte Malonsäurerest von C-14-Malonyl-Coenzym A auf Pantethein übertragen wird (Gl. 10a,c). Die Abtrennung des im Test entstandenen C-14-Malonylpantethein vom Inkubationsansatz wird durch Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt. Um das Reaktionsprodukt vom Austauschermaterial zu lösen, sind relativ große Mengen Elutionsmittel nötig. Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgt jedoch nur mit einem Bruchteil der Elutionslösung, da im Flüssigkeitsszintillationszähler nur kleine Mengen wässriger Lösung ausgezählt werden können (21,25). Die hohe spezifische Radioaktivität der von uns dargestellten C-14-Malonyl-Coenzym A-Präparate hätte ausgereicht, um diesen Nachteil auszugleichen. Malonylpantethein ist jedoch mit Methyläthylketon fast quantitativ aus angesäuerten und mit Ammoniumsulfat versetzten wässrigen Lösungen extrahierbar. Da Malonyl-CoA dieses Verhalten nicht oder nur in ganz geringem Ausmaß zeigt, konnten wir eine einfache und rasche

durchführbare Trennung der beiden radioaktiven Substanzen auf dieser Grundlage standardisieren. Die Beschreibung dieses Testsystems findet sich im experimentellen Teil auf S. 85.

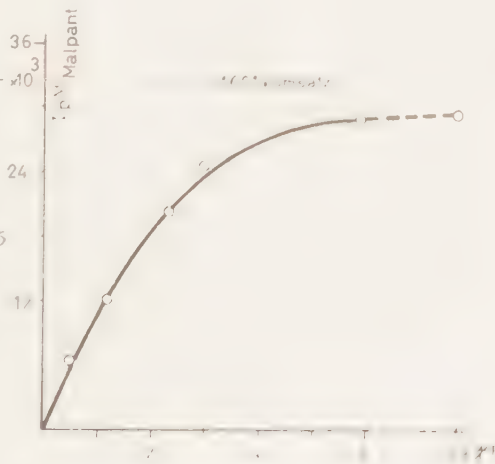
Eine mit dieser Methode gemessene Enzymabhängigkeit ist in Abb. 19 wiedergegeben.

Es war zu erwarten, daß diese Transacylierung zwischen den ähnlich aufgebauten Thiolen Pantethein und Coenzym A ohne Änderung der Freien Energie, also entsprechend einer Gleichgewichtskonstante $K = 1$, abläuft. Im Experiment äquilibrierte sich die Transferreaktion, nachdem 91% des anfangs vorhandenen Malonyl-CoA in Malonylpantethein überführt worden waren. Das molare Verhältnis der Reaktionspartner war 1 : 11. Aus diesen Daten läßt sich für die Übertragungsreaktion eine Gleichgewichtskonstante $K = (\text{Malpant}) (\text{CoA}) / (\text{Mal-CoA}) (\text{Pant}) = 0,91$ berechnen.

Tab. 4 faßt die Ergebnisse einer Versuchsreihe zusammen, in der die Gleichgewichtseinstellungen bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen wurden. Der Mittelwert beträgt $K = 0,86 \pm 0,16$. Die Erwartung, daß sich die Transferreaktion entsprechend einer Gleichgewichtskonstanten $K = 1$ äquilibriert, wird also gut erfüllt.

Abb. 19:

Enzymabhängigkeit
der Malonyltransferase.
0,054 μMol 2-C-14-
Malonyl-CoA
(32900 IpM)
0,6 μMol Pantethein,
3 min Reaktionszeit
Durchführung s. S.85
FSS-Aktivität:
1800 mE/mg,
Malonyltransferase-
Aktivität:
6030 mE/mg.



MalCoA (μ Mol zu Reaktionsbeginn)	0,1	0,06	0,06	0,06	0,04	0,02
Pant	0,05	0,6	0,6	0,06	0,2	0,1
Malpant (μ Mol im Gleichgewicht)	0,03	0,055	0,054	0,028	0,033	0,016
K	0,64	1,1	0,9	0,76	0,93	0,76
K (Mittelwert)	0,86 $\pm$ 0,16					

Tab. 4: Gleichgewichtseinstellungen der Malonyltransferase-reaktion bei verschiedenen Substratkonzentrationen. Jeweils 15 und 30 μ FSS eingesetzt, Reaktionszeit 10 min. Durchführung auf S.85 beschrieben.

Selbstverständlich kann die Gleichgewichtslage der Übertragungsreaktion nur bestimmt werden, wenn reines C-14-Malonyl-Coenzym A im Test eingesetzt wird. Enthält das Präparat radioaktive Verunreinigungen, die von Fettsäuresynthetase nicht umgesetzt werden, dann ist seine spezifische Radioaktivität zu hoch vorgetäuscht und es wird eine scheinbar geringere Gleichgewichtskonstante gemessen.

Wir experimentierten zunächst mit einem C-14-Malonyl-Coenzym A-Präparat, das sich im Radiopapierchromatogramm nach (21) (Abb. 20) und in einem Radiodünnschichtchromatogramm einheitlich verhielt (Abb. 21). Der Verlauf der mit diesem Präparat gemessenen Enzymabhängigkeit entsprach der in Abb. 19 dargestellten Kinetik. Die Transferreaktion äquilibrierte sich jedoch bereits, nachdem 53% des Malonyl-CoA umgesetzt waren, entsprechend einer Gleichgewichtskonstanten $K = 0,063$.

Auch aus den Meßergebnissen anderer Autoren (21 bzw. 61,62,57) kann berechnet werden, daß die Übertragung des Acylrestes von Acyl-Coenzym A auf Pantethein entsprechend einer Gleichgewichtskonstanten dieser Größenordnung erfolgt.

Malonylpantethein ist jedoch kein energiereicherer Thioester als Malonyl-Coenzym A, denn das Gleichgewicht der Übertragung des Malonylrestes von Malonylpantethein auf Coenzym A liegt bei $K = 1$: Wir setzten im Testsystem statt 2-C-14-Malonyl-Coenzym A 0,042 μ Mol 2-C-14-Malonylpantethein (54800 IpM) und statt Pantethein

0,008 μ Mol Coenzym A ein (10-30% FSS, 15 min Reaktionszeit).
Im Gleichgewicht fanden wir 0,035 μ Mol Malonylpantethein. Setzt man eine Gleichgewichtskonstante $K = 1$ voraus, dann folgt aus dem gewählten Substratverhältnis, daß im Gleichgewicht 0,036 μ Mol vorliegen müssen, die Voraussetzung ist also berechtigt.



Abb. 20:



Abb. 21:

Abb. 22:

Abb. 20: Radiopapierchromatogramm von 2-C-14-Malonyl-CoA nach (21).
Aufsteigend im System 0,1 M Acetatpuffer pH = 4,5/96%iges
Äthanol (1:1, v/v) chromatographiert. Papiersorte Whatman 1.

Abb. 21: Radiodünnschichtchromatogramm von 2-C-14-Malonyl-CoA.
System: Kieselgel - 0,1 M Acetatpuffer pH = 4,5 / 96%iges
Äthanol (1:1, v/v).

Abb. 22: Radiodünnschichtchromatogramm von 2-C-14-Malonyl-CoA.
System: Cellulose - n-Butanol/Wasser/Eisessig (4:5, v/v)
(Oberphase)

Im Verlauf weiterer Messungen stellte sich heraus, daß das verwendete C-14-Malonyl-Coenzym A-Präparat radioaktive Verunreinigungen enthielt. Das in Abb. 22 dargestellte Radiochromatogramm zeigt die Uneinheitlichkeit des Präparates. Die Dünnschichtchromatographie gemäß Abb. 21 und die Papierchromatographie nach (20) (Abb. 20) stellen offensichtlich noch kein ausreichendes Kriterium für die Reinheit des C-14-Malonyl-Coenzym A dar. Käufliches Coenzym A enthält also offenbar Verunreinigungen, die bei der Darstellung von C-14-Malonyl-CoA störende Nebenprodukte ergeben, welche von Fettsäuresynthetase nicht umgesetzt werden. Wir haben die Verunreinigungen nicht näher untersucht. Die Handelspräparate unterscheiden sich stark in ihrem Gehalt an Coenzym A, verschiedene Chargen enthielten 60 bis 85 Gewichtsprozent Coenzym A.

Durch eine Vorbehandlung mit organischem Lösungsmittel - im experimentellen Teil auf Seite 73 beschrieben - konnten wir Coenzym A von Verunreinigungen befreien. Die aus vorbehandeltem Coenzym A dargestellten C-14-Malonyl-Coenzym A-Präparate erwiesen sich als chromatographisch rein (Abb. 23) und ergaben die erwartete Gleichgewichtseinstellung (K ca. 1) im Übertragungstest (Abb. 19 und Tab. 4).

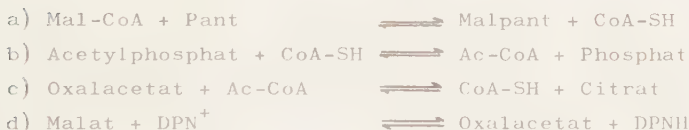


Abb. 23: Radiodünnschichtchromatogramm von 2-C-14-Malonyl-CoA. System s. Abb. 22.

b) Nachweis von C-14-Malonylpantethein und Coenzym A als Produkte der Modellreaktion.

Das radioaktive Produkt der Modellreaktion verhielt sich in der Dünnschichtchromatographie wie authentisches Malonylpantethein (Abb. 66, S.76). Das Reaktionsprodukt wird außerdem von Fettsäuresynthetase im Test der Gesamtreaktion umgesetzt (Abb. 30).

Die Entstehung des während der Transferreaktion frei werdenden Coenzym A läßt sich optisch verfolgen, wenn man diese Reaktion (Gl. 11a) mit den enzymatischen Reaktionen der Phosphotransacetylase (Gl. 11b) und Citratsynthase (Gl. 11c) koppelt. Das in der vorgeschalteten Malatdehydrogenasereaktion (Gl. 11d) entstehende DPNH ist Meßgröße der Reaktionsfolge*).



Gl. 11

Die Kinetik der Reaktion ist in Abb. 28 wiedergegeben. Das beim Malonyltransfer freigesetzte Coenzym A (Gl. 11a) veranlaßt die zusätzliche Entstehung von Coenzym A gemäß Gl. 11c. Die Geschwindigkeit des DPN⁺-Verbrauchs sollte also während der Reaktion zunehmen. Dies war der Fall, wie der überproportionale Verlauf der Kinetik in Abb. 24 zeigt.

*) Optischer Malonyltransferase-Test (Anmerkung bei der Korrektur): 1 ml 0,1 M Tris/HCl, pH = 7,5 enthält: 60 nMol MalCoA, FSS, 10 µMol Acetylphosphat, 10 E Phosphotransacetylase. Start der Reaktion mit 2 µMol N-Acetylcysteamin. Meßgröße ist die mehrere Minuten lang linear zunehmende Thioesterabsorption des in der Hilfsreaktion entstehenden Acetyl-Coenzym A bei 233 mµ. (ΔE₂₃₃/min · FSS ca. 0,1) Die Enzymabhängigkeit ist mindestens im Bereich 4-20% FSS linear.

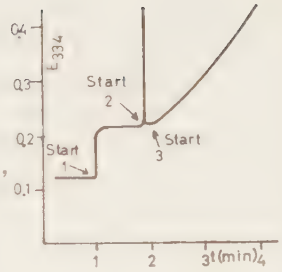
Abb. 24: Kinetik des DPN^+ -Verbrauchs in der Reaktionsfolge der Gl. 11 a-d.

Die Küvette, $d = 1\text{cm}$, enthielt in 1 ml Wasser: 200 μMol Tris, $\text{pH} = 8,1$, 10 μMol (R.S) - Malat, 3 μMol DPN^+ , 4,4E Citratsynthase, 10E Phosphotransacetylase, 4 μMol Acetylphosphat, und je nach dem bei (Pfeil 3) eingesetzten Startagens zwei der folgenden Präparate:

0,2 μMol Pantethein, 0,05 μMol Mal-CoA, 0,1 μMol FSS.

Nach Zusatz von 11E Malatdehydrogenase stellt sich das Gleichgewicht der Indikatorreaktion ein (68) (Pfeil 1). Bei (Pfeil 3) wird die Malonyltransferasereaktion durch Zugabe von einem der drei genannten Präparate gestartet.

Wenn der Ansatz alle Zusätze außer Mal-CoA enthält, können die Hilfsreaktionen auch mit 0,2 μMol Coenzym A in Gang gebracht werden (Pfeil 2).



c) Charakterisierung der Malonyltransferase.

Die folgenden Messungen charakterisieren die Teilreaktion. Eine Enzymabhängigkeit ist in Abb. 19, eine Zeitabhängigkeit in Abb. 25 aufgezeichnet. Die aus den Substratabhängigkeiten (Abb. 27 u. 28)

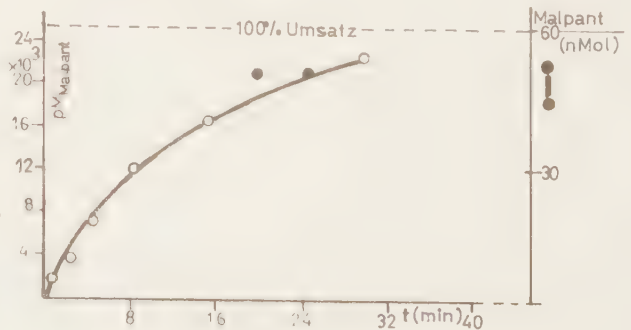
Abb. 25:

Malonyltransferase, Zeitabhängigkeit.

0,06 μMol 2-C-14-Malonyl-CoA (25700 IpM)
0,6 μMol Pantethein,
0,95 μMol FSS,
FSS-Aktivität:
1900 mE/mg,
Malonyltransferase-aktivität:
8200 mE/mg.

(o—o): Ausführung s. S. 85

(●—●): Bestimmung im optischen Gesamtaktivitätstest, wie in der Legende von Abb. 67 beschrieben.



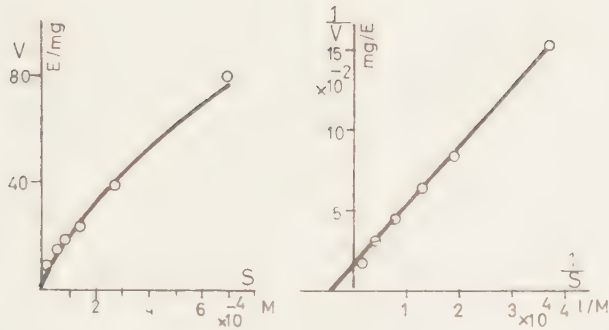


Abb. 26: Malonyltransferase, Malonyl-CoA-Abhängigkeit und Auswertung nach (31).
Ausführung s. S. 85

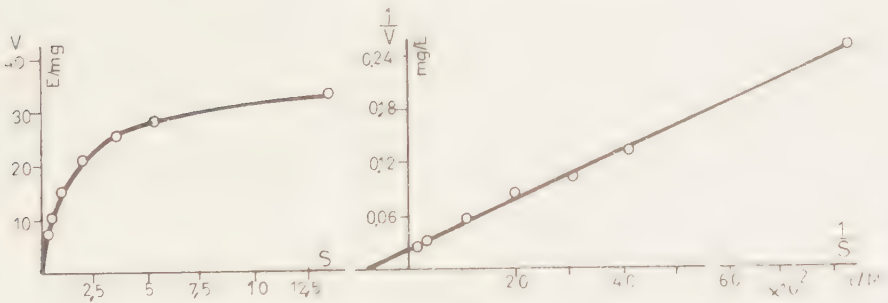


Abb. 27: Malonyltransferase, Pantetheinabhängigkeit und Auswertung nach (31).
Ausführung s. S. 85

bestimmten kinetischen Konstanten betragen $K_M(\text{Mal-CoA}) = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ ($5 \cdot 10^{-3}$ Pantethein), $v_{\text{Max}} = 70 \text{ E/mg}$ und $K_M(\text{Pantethein}) = 1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ($7 \cdot 10^{-4} \text{ M Malonyl CoA}$), $v_{\text{Max}} = 48 \text{ E/mg}$.

Die Messungen der Enzymabhängigkeit (Abb. 19) und der Zeitabhängigkeit (Abb. 25) mit dem von uns beschriebenen Testsystem wurden mit Substratkonzentrationen durchgeführt, die auch in dem von ZIEGENHORN (25) und SCHWEIZER et al (69) benützten Testsystem Verwendung fanden, von den Angaben HAGENS (21) weichen sie geringfügig ab.

Unsere Messungen ergeben, daß die Teilreaktion unter diesen Bedingungen bei verschiedenen Enzympräparaten rund zwei bis fünfmal schneller verläuft als der Einbau von Malonsäure in die höheren Fettsäuren. Dies stimmt mit den Beobachtungen von HAGEN und SCHWEIZER et al überein.

Die Auswertungen der Substratabhängigkeiten (S. 31) zeigen, daß das Enzym unter diesen Bedingungen nicht gesättigt ist und daß wesentlich höhere Umsatzzahlen erreicht werden können.

3. Die Übertragung des Malonsäurerestes auf die zentrale SH-Gruppe. Hemmung durch Coenzym A.

Gemäß der schematischen Darstellung in Gl. 10 a,b,c kann der auf die X- oder Y-Gruppe übertragene Acylrest entweder rückübertragen werden auf Coenzym A (bzw. Pantethein) oder aber auf die zentrale SH-Gruppe transferiert werden. Die Modellreaktion läuft wesentlich rascher ab als die Gesamtreaktion, die Erhöhung der Coenzym A-Konzentration sollte also zunehmende Transfargeschwindigkeit der Malonsäurereste auf Coenzym A zur Folge haben und damit die Geschwindigkeit der Übertragung auf die zentrale SH-Gruppe abnehmen. Die daraus zu folgernde Hemmbarkeit der Fettsäuresynthesegeschwindigkeit durch Zugabe des kompetitiven Akzeptors Coenzym A wird durch Abb. 28 gezeigt. Das Meßergebnis entspricht früheren Beobachtungen von SCHWEIZER (23).

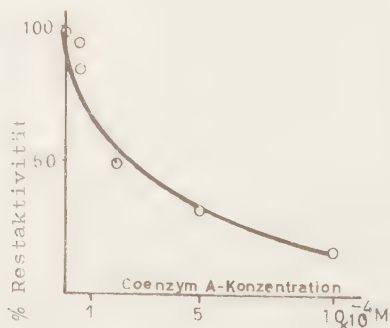


Abb. 28: Hemmung der Gesamtaktivität (S. 83) durch Coenzym A.

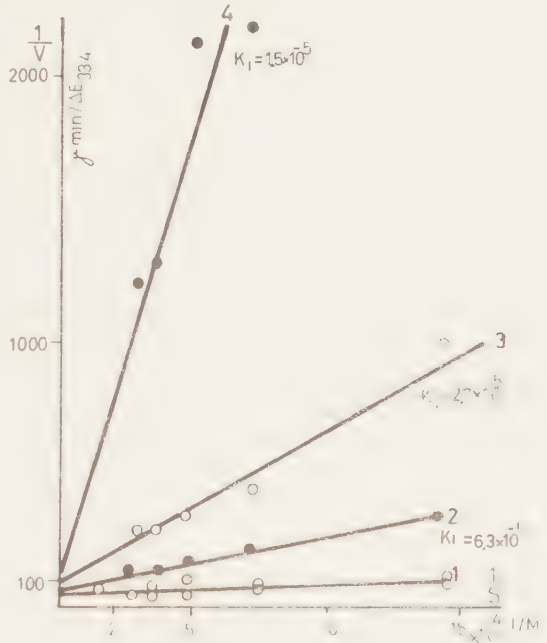
Die Abhängigkeit der Coenzym A-Hemmung von der Malonyl-Coenzym A-Konzentration wird durch die reziproke Darstellung in Abb. 29 beschrieben.

Abb. 29:

Hemmung der Gesamtaktivität (S. 83) durch Coenzym A bei verschiedenen Malonyl-CoA-Konzentrationen. Auftragung der reziproken Aktivitätswerte gegen die reziproken Malonyl-CoA-Konzentrationen bei verschiedenen konstanten Coenzym A-Konzentrationen.

- (1) ohne
 - (2) $2,6 \cdot 10^{-4} M$
 - (3) $5,2 \cdot 10^{-4} M$
 - (4) $1,04 \cdot 10^{-3} M$
- Coenzym A

Die Inhibitor konstanten K_i (M) wurden nach (70) aus den Steigungen der Geraden berechnet.



Die Michaeliskonstante für Malonyl-CoA beträgt $K_M = 5 \cdot 10^{-6} M$ und steht in guter Übereinstimmung mit früheren Angaben (24). Die Hemmkonstanten für Coenzym A, nach (70) aus den Steigungen der Geraden in Abb. 29 berechnet, liegen in der Größenordnung $10^{-5} M$. Die hemmende Wirkung von Coenzym A auf die Fettsäuresynthese ist also gering.

4. Acetyltransferase

a) Radioaktive Bestimmungsmethode

Die Acetyltransferase des Multienzymkomplexes wird ebenfalls gemäß Gl. 10 a,c nachgewiesen. Die Geschwindigkeit der Übertragung des C-14-Acetylrestes von C-14-Acetyl-CoA auf Pantethein charakterisiert die Aktivität des Teilenzymes (21,25).

Das gebildete C-14-Acetylpantethein trennten wir wiederum selektiv durch Ausschütteln mit Methyläthylketon aus dem Inkubationsansatz ab. Die Einzelheiten des Testsystems und die Darstellung des hier eingesetzten C-14-Acetyl-CoA sind auf S.87 bzw. S.77 beschrieben. Wegen der deacylierenden Wirkung der Fettsäuresynthetase (23,24,36) konnten wir nicht grundsätzlich ausschließen, daß C-14-Essigsäure als Reaktionsprodukt auftritt. Essigsäure ist jedoch nur aus saurer Lösung extrahierbar, die im Übertragungstest entstehende Substanz aber sowohl aus angesäuertem als auch aus neutralem Milieu. Dieses Verhalten determiniert eindeutig C-14-Acetylpantethein als Produkt der Transferreaktion.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Enzym-(Abb.30) und Substratabhängigkeiten (Abb. 31 und 32) der Acetylübertragung.

Die spezifische Aktivität liegt in der Größenordnung $0,5 - 2 \cdot 10^2$ mE/mg, wenn die in der Legende der Abb. 30 angegebenen Substratkonzentrationen eingesetzt werden.

Die Acetyl-CoA-Konzentrationen liegen in der gleichen Größenordnung wie beim Test der Gesamtreaktion. Die Fettsäuresynthetaseaktivität ist jedoch größer als die Aktivität der Teilreaktion. Setzt man voraus, daß die Übertragung des Acetylrestes auf die Y-Gruppe bei beiden Reaktionen gleich schnell erfolgt, dann ist zu schließen, daß der folgende Transfer auf den enzymgebundenen Pantetheinrest rascher verläuft als auf den niedermolekularen Acceptor. Im Gegensatz dazu wird der Malonylrest schneller auf Pantethein übertragen (vgl. S.29), die Unterschiedlichkeit der beiden Transferasen tritt also auch bei der Übertragungsreaktion auf.

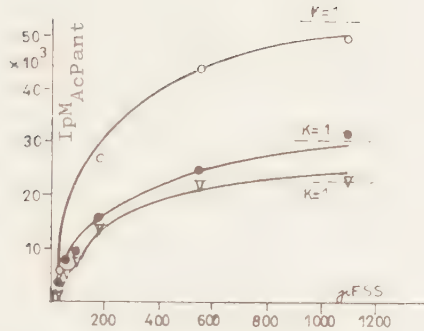


Abb. 30: Acetyltransferase, Enzymabhängigkeit.
Reaktionsdauer 5 min. Ausführung s. S. 87

Kurve 1: 0,10 μMol 1-C-14-Acetyl-CoA u. 0,376 μMol Pantethein

Kurve 2: 0,15 μMol 1-C-14-Acetyl-CoA u. 0,428 μMol Pantethein

Kurve 3: 0,2 μMol 1-C-14-Acetyl-CoA ($2,76 \cdot 10^5 \text{ IpM}/\mu\text{Mol}$) 2,14 μMol Pantethein

Die theoretischen Werte der Gleichgewichtseinstellungen bei einer Gleichgewichtskonstante $K=1$ sind eingezeichnet.

FSS-Aktivität: 1100 mE/mg

Acetyltransferase-Aktivität:

Kurve 1: 60 mE/mg

Kurve 2: 95 mE/mg

Kurve 3: 185 mE/mg

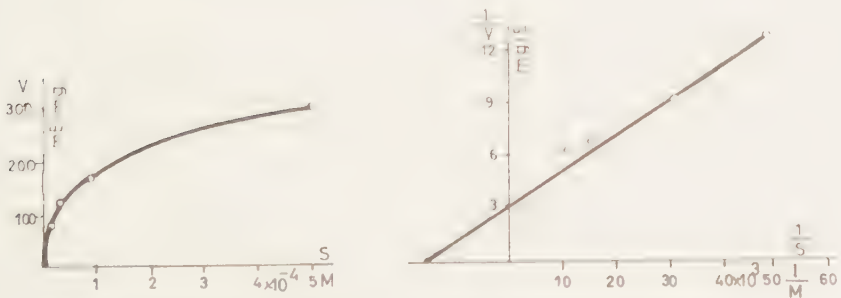


Abb. 31: Acetyltransferase, Acetyl-CoA-Abhängigkeit und Auswertung nach (31).

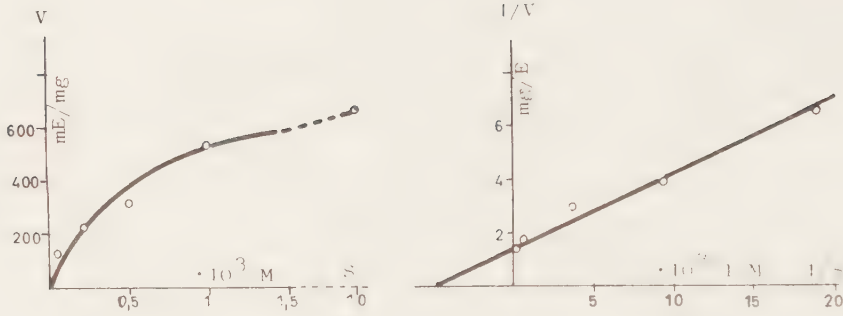
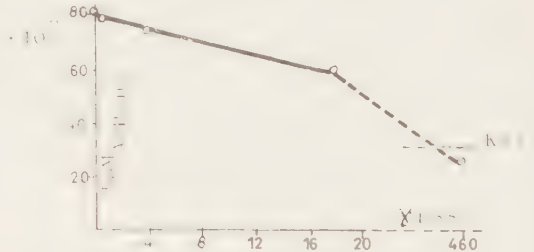


Abb. 32: Acetyltransferase, Pantetheinabhängigkeit und Auswertung nach (31).

Abb. 33: Acetyltransferase, Rückreaktion der Modellreaktion, Enzymabhängigkeit.
Reaktionszeit 5 min.
0,06 μ Mol 1-C-14-Acetylpantethein (81200 IpM)
0,1 μ Mol Coenzym A
FSS-Aktivität: 950 mE/mg



Die Auswertung der Substratabhängigkeiten ergibt für Acetyl-CoA die Konstanten $K_M = 6,7 \cdot 10^{-5} M$ ($2 \cdot 10^{-4} M$ Pantethein) und $V_{Max} = 330 mE/mg$ und für Pantethein $K_M = 2,5 \cdot 10^{-4} M$ ($3 \cdot 10^{-4} M$ Acetyl-CoA) und $V_{Max} = 670 mE/mg$.

Die in Abb. 30 dargestellten Enzymabhängigkeiten sind also nicht bei Enzymsättigung gemessen worden, und es können höhere Umsatzzahlen erreicht werden, als es dort der Fall war.

Die Enzymabhängigkeit der Rückreaktion des Acetyltransfers mit C-14-Acetylpantethein und Coenzym A als Ausgangsprodukte ist in Abb. 33 aufgezeichnet.

Legt man für die Umesterungsreaktion eine Gleichgewichtskonstante von $K = 1$ zugrunde, dann wird diese Bedingung in den Enzymabhängigkeiten der Abb. 30 und der der Abb. 33 gut erfüllt.

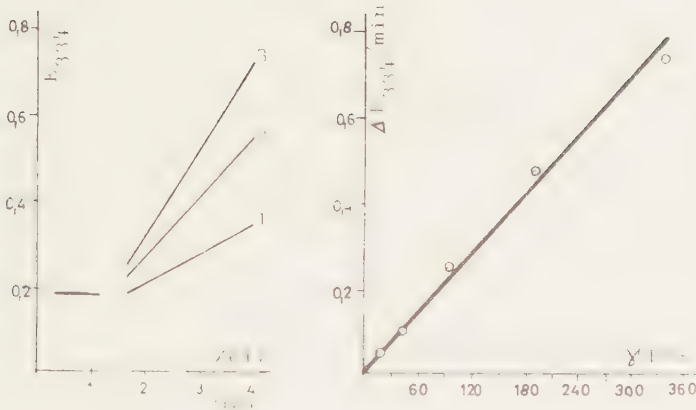


Abb. 34: Acetyltransferase, optische Bestimmungsmethode mit dem gekoppelten Enzymsystem der Gl. 12 a,b,c.
Links: Zeitabhängigkeit mit der einfachen, doppelten und dreifachen Menge FSS (1,2,3)
Rechts: Enzymabhängigkeit
Ausführung s. S. 88

b) Optische Bestimmungsmethode

Das gemäß Gl. 12a in der Transferreaktion entstehende Acetyl-CoA kann optisch gemessen werden, wenn es mit Oxalacetat und Citratsynthase als Hilfsenzym zu Citrat umgesetzt wird (Gl. 12b). Oxalacetat wird in der vorgeschalteten Indikatorreaktion der Gl. 12c aus Malat und DPN^+ mit Malatdehydrogenase hergestellt. Diese Methode ist möglich, weil Citratsynthase zwar Acetyl-CoA, jedoch nicht Acetylpantethein umsetzt (66).

Liegen die beiden Hilfsenzyme in Überschuss vor, dann hängt die Geschwindigkeit der Übertragungsreaktion (Gl. 12a) nur von der vorliegenden Synthetasemenge ab. In Abb. 34 ist die Zeitabhängigkeit

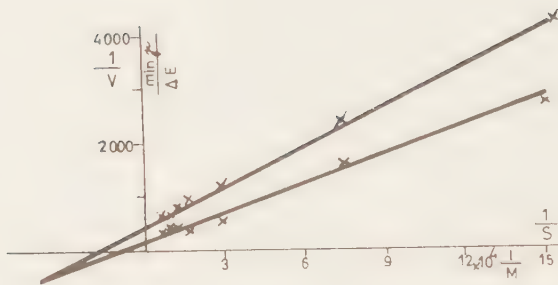


Abb. 35: Acetyltransferase, Coenzym A-Abhängigkeit in der reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk.

- (1) $86,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Acetylpantethein
 (2) $34,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ Acetylpantethein

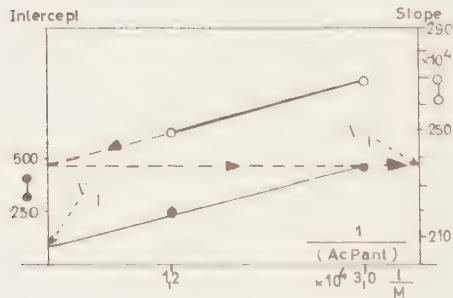


Abb. 36: Graphische Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes der Abb. 35. Vgl. S. 18

- (●—●): Auftragung der reziproken
 (Intercept) Acetylpantethein-Konzentrationen
 gegen die Schnittpunkte der
 Geraden mit der Ordinate in Abb. 35
 (○—○): Auftragung der reziproken Acetyl-
 pantethein-Konzentration gegen die
 Steigungen der Geraden in Abb. 35

der gekoppelten Reaktionsfolge bei verschiedenen Enzymkonzentrationen aufgetragen.



Gl. 12

Meßgröße ist die optische Dichte des entstehenden DPNH.

In Abb. 35 sind die reziproken Coenzym A-Konzentrationen gegen die reziproken Aktivitäten aufgetragen. Zwei verschiedene Acetylpantetheinkonzentrationen sind jeweils konstant gehalten. Die Gleichung, mit der eine enzymatisch katalysierte Reaktion, an der zwei Substrate teilnehmen, beschrieben wird, ist auf S. 16 wiedergegeben. Hier bedeutet (A) die Coenzym A-Konzentration und (B) die Acetylpantethein-Konzentration.

Die graphische Auswertung des Lineweaver-Burk-Diagrammes der Abb. 35 nach (44) ergibt die kinetischen Parameter der Transferase-reaktion (Abb. 36). (Vgl. hierzu S. 18). Die kinetisch definierte Michaeliskonstante für Coenzym A ermittelt sich zu $K_A = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und diejenige für Acetylpantethein zu $K_B = 1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$. Die Dissoziationskonstante für den Coenzym A-Fettsäuresynthetase-Komplex beträgt $K'_A = 7,5 \cdot 10^{-6}$. Die Dissoziationskonstante ist allerdings nur dann ein sinnvoller Wert, wenn die Reaktion nach einem geordneten Mechanismus verläuft (52) und Coenzym A als erstes Substrat vom Enzym gebunden wird. Wenn das Enzym mit beiden Substraten gesättigt ist, erreicht der maximale DPN⁺-Verbrauch einen Wert von $V_1 = 0,008 \text{ E/min.}$

Wegen der Gleichgewichtslage der Hilfsreaktionen (Gl. 12 b,c) (BUCKEL und EGGERER, 68) kann das in der Transferreaktion entstehende Acetyl-CoA nicht direkt aus dem DPN^+ -Verbrauch errechnet werden. Die Anfangsgeschwindigkeit der Hilfsreaktionen muß mit dem Korrekturfaktor $f = 2,00$ multipliziert werden, wenn die Acetyl-CoA-Konzentration im System Null ist (68). Im gekoppelten Testsystem mit den beiden Hilfsenzymen im Überschuß kann die "steady-state"-Konzentration des Acetyl-Coenzym A als praktisch Null angenommen werden.

Die mit dem Faktor 2 multiplizierte Geschwindigkeit V_1 entspricht dann also der Umsatzzahl des Acetylantetheins:

$V = 2 \cdot V_1 = 0,0164 \text{ E/min.}$ 1 mg substratgesättigte Fettsäuresynthetase katalysiert demnach pro Minute den Umsatz von 2670 nMol Acetylantethein entsprechend einer spezifischen Aktivität von 2670 mE/mg.

Die Fixierbarkeit des Acetylrestes an die Y-Gruppe der Fettsäuresynthetase, die durch die Beladungsversuche von SCHWEIZER und OESTERHELT gezeigt wurde, und die ZIEGENHORN durch Isolierung der Acetylserinpeptide nachweisen konnte (s. Einleitung S. 2), sowie der Befund, daß die kovalent, aber nicht thioesterartig gebundenen Acetylreste unter Bildung von Essigsäure kontinuierlich deacyliert werden (23,24,36), lassen erwarten, daß auch der enzymatisch katalysierte Acetyltransfer in diesem Sinne verläuft. Das Enzym bindet dann den Acetylrest kovalent, wobei gleichzeitig Coenzym A abgespalten wird, und die weitere Reaktion erfolgt von dieser Acetyl-Enzym-Zwischenverbindung aus. Die Übertragungsreaktion sollte also entsprechend dem "double-displacement-Mechanismus" (73) bzw. der kinetisch definierbaren Ping-Pong-Kinetik (52,71) verlaufen.

Eine andere Möglichkeit wäre ein Mechanismus, bei dem die Übertragung des Acetylrestes auf der Stufe eines ternären Acetyl-pantethein-Coenzym A-Enzymkomplexes erfolgt.

Die Lage der beiden Geraden in Abb. 35 und ihr Schnittpunkt könnten zu der Vermutung Anlaß geben, daß der letztgenannte Mechanismus der zutreffende ist. Für eine eingehende kinetische Analyse müssten allerdings der Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Acetylpantetheinkonzentration besser gesichert und definierte Produktinhibierungsexperimente durchgeführt werden.

7. Palmityltransferase. Einige Messungen zur Spezifität dieses Teilenzymes.

Die Übertragung des aus Acetyl- und Malonyl-CoA synthetisierten Palmitylrestes von Fettsäuresynthetase auf Coenzym A kann verhindert werden, wenn in das Testsystem für die Bestimmung der Gesamtaktivität zusätzlich Phosphotransacetylase und Acetylphosphat gegeben wird. Überschüssige Phosphotransacetylase wandelt das während der Fettsäuresynthese entstehende Coenzym A rasch in Acetyl-CoA um, so daß der Palmityltransfer auf CoA und damit die Fettsäuresynthese zum Erliegen kommt. Phosphotransacetylase ist streng substratspezifisch, bereits Dephospho-Coenzym A wird praktisch nicht mehr umgesetzt (66). Die Fettsäuresynthese kann deshalb mit Pantethein wieder in Gang gebracht werden.

Ebenso kann mit den Acceptor-Modellen N-Acetylcysteamin und Cysteamin wieder gestartet werden. In Abb. 38 und 39 sind die Substratabhängigkeiten dieser Reaktionen aufgezeichnet.

Abb. 37:

Verhinderung der Fettsäuresynthese mit Phosphotransacetylase.

Durchführung wie Bestimmung der Gesamtaktivität (s.S. 83), statt 100 $\mu\text{Mol KPO}_4$, pH = 6,5 wurden 100 $\mu\text{Mol Tris/HCl}$ pH=7,5 eingesetzt.

Die Mischung enthielt zusätzlich 0,45 mg Acetylphosphat.

Start der Reaktion durch Mal-CoA (1), Hemmung durch 100 E Phosphotransacetylase (2), erneuter Start mit 0,075 μMol Pantethein (3).

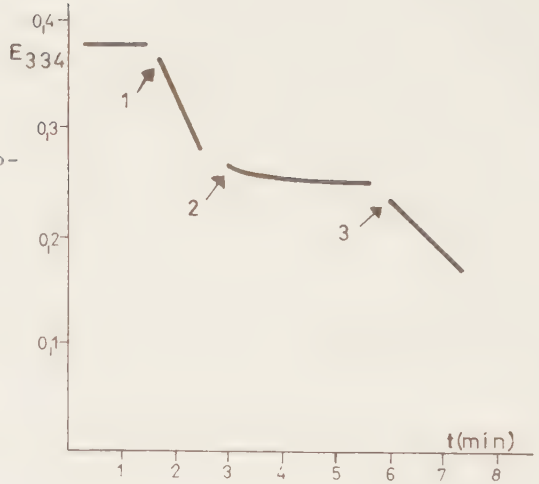
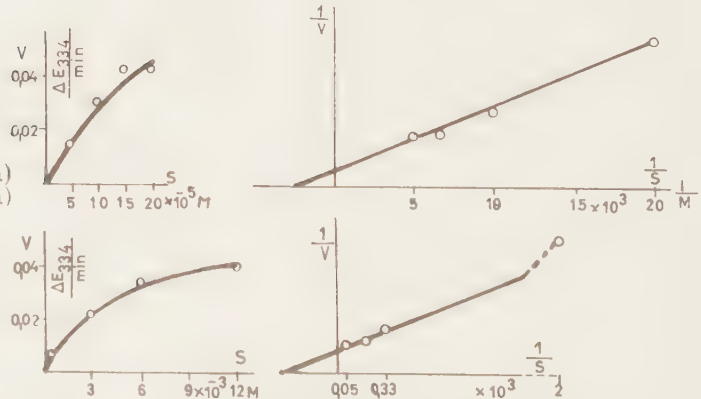


Abb. 38: (oben)

Abb. 39: (unten)

Die Wirkung von Acceptor-Modellen in der Reaktion der Palmityl-übertragung. Durchführung wie in der

Legende der Abb. 37 beschrieben, jedoch wurden 50 E Phosphotransacetylase eingesetzt und statt mit Pantethein wurde mit verschiedenen Mengen N-Acetylcysteamin (Abb. 38) bzw. Cysteamin (Abb. 39) gestartet.



Mit beiden Substraten kann etwa 70% der Synthesegeschwindigkeit unter Normalbedingungen wiederhergestellt werden. Die Michaeliskonstanten betragen $K_M = 4 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ (N-Acetylcysteamin) und $K_M = 3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ (Cysteamin).

Die Affinität des Enzymes zum Cysteamin ist also deutlich geringer als zum N-Acetylcysteamin. Offenbar ist das Strukturelement der Säureamidgruppe in N-Acetylcysteamin bzw. Coenzym A ein wesentlicher Bestandteil des Acceptors.

6. Die Wirkung von Hemmstoffen auf die Aktivität der Acyltransferasen.

a) Der Serininhibitor Phenylmethansulfonylfluorid.

Viele Enzyme, die Serin im aktiven Zentrum enthalten, werden durch Phenylmethansulfonylfluorid inaktiviert. Die Wirkung beruht darauf, daß die Hydroxylgruppe von Serin blockiert wird (74). Die Aktivität der Fettsäuresynthetase wird jedoch nicht gehemmt. Nach einstündiger Inkubation des Enzymes mit dem Hemmstoff (12 mg FSS/ml, 0,1 M Tris/HCl pH = 7,5, 1 mM PMSF) bei 0°C und 25°C war keine Aktivitätsabnahme festzustellen (Vgl. auch S.45). Die Serinhydroxylgruppen in den aktiven Zentren der Transferasen (s. S. 2f) reagieren also offenbar nicht mit dem Hemmstoff. Es ist möglich, daß die Hydroxyle der X- und Y-Gruppen zu wenig aktiviert sind, um mit dem Inhibitor in Reaktion treten zu können, denn diese Art Hemmstoff reagiert nur dann, wenn durch die Peptidstruktur im aktiven Zentrum besondere Aktivierungsverhältnisse gegeben sind (74,75).

b) Das Schwefelgift N-Äthylmaleinimid

N-Äthylmaleinimid reagiert mit den reaktiven Thiolgruppen des Multienzymkomplexes und die Fettsäuresynthese wird gehemmt (24,25). Frühere Versuche verschiedener Autoren, die Aktivität der Malonyl- und der Acetyltransferase mit Schwefelgiften zu hemmen, erbrachten unterschiedliche Ergebnisse. Eine tabellarische Übersicht dieser Befunde ist in (25) niedergelegt.

Abb. 40:

Der Einfluß von NÄM auf die Aktivität der Malonyltransferase.

0,06 μ Mol (34000 IpM) 2-C-14-Malonyl-CoA

0,6 μ Mol Pantethein

Reaktionszeit 5 Min.

- o ungehemmte FSS (FSS-Akt. 1550 mE/mg)
- ▼ gehemmte FSS (FSS-Akt. 25 mE/mg) 10^{-2} M NÄM, 5 Min., 0° C)

(s. S. 85 + 88)

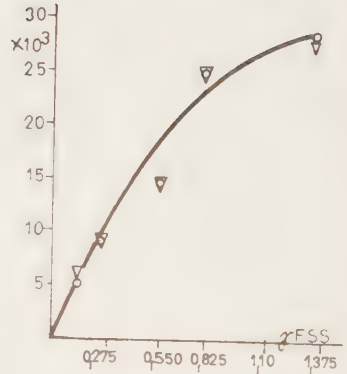


Abb. 41:

Der Einfluß von NÄM auf die Aktivität der Acetyltransferase. (optischer Test s.S. 88)

- o ungehemmte FSS (FSS-Akt. 1050 mE/mg)
- ▼ gehemmte FSS (FSS-Akt. 20 mE/mg)

(Zur Ausführung der Hemmung s. S. 88, 10^{-2} M NÄM, 5 Min., 0° C)

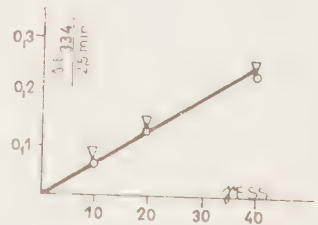


Abb. 42:

Aktivität der Malonyltransferase nach langer Einwirkung von NÄM (10^{-2} M NÄM, 0° C)

Fettsäuresynthetase-aktivität:

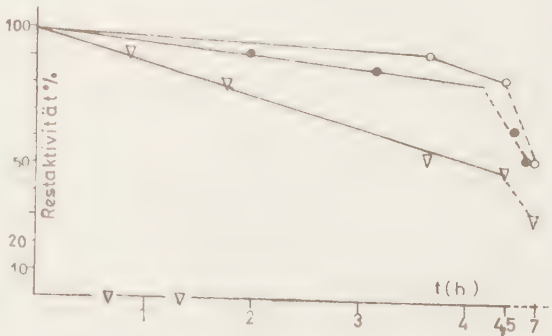
1700 mE/mg

Malonyltransferase-aktivität:

7900 mE/mg

Malonyltransferase-aktivität, ungehemmt: (o-o), gehemmt: (▼-▼)

Fettsäuresynthetase-aktivität, ungehemmt: (●-●), gehemmt: (▼-▼)



Unsere Experimente ergaben, daß weder die Aktivität der Malonyltransferase noch die der Acetyltransferase durch NÄM geändert wird (Abb. 40 und 41).

Bei diesen Acyltransferasen sind also keine Enzymelemente beteiligt, die durch NÄM hemmbar sind. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von ZIEGENHORN et al (20) und SCHWEIZER et al (10), wonach das aktive Zentrum dieser Transferasen keine Mercaptane enthält.

Wenn der Hemmstoff jedoch über einen Zeitraum von mehreren Stunden einwirken kann, dann wird durch die Reaktion weiterer Thiolgruppen des Enzymes offenbar die räumliche Struktur der Malonyltransferase so verändert, daß allmähliche Aktivitätsminderung eintritt (Abb. 42).

C. Die enzymatischen Aktivitäten des in Untereinheiten gespaltenen Multienzymkomplexes.

1. Vorbemerkung zur Spaltung

Die Spaltung des Enzymkomplexes mit Desoxycholsäure (HAGEN, 21), Salzsäure oder Harnstoff (WILLECKE, 45) führte zu Untereinheiten, die sich in der Ultrazentrifuge einheitlich verhielten und entsprechend einer Svedbergkonstanten von etwa acht sedimentierten, was einem Molekulargewicht in der Größenordnung 10^2 entspricht.

SCHWEIZER et al (76) konnten den Multienzymkomplex mit Natrium-Dodecylsulfat in Untereinheiten ähnlicher Größe spalten. Mit Hilfe der SDS-Elektrophorese gelang es, zwei Untereinheiten nachzuweisen, die Molekulargewichte von etwa 185 000 (Komponente A) und 180 000 (Komponente B) haben. Durch Zusatz des Serinmodifikators Phenylmethansulfonylfluorid (vgl. S.43) während der Anreicherung des Enzymes konnte die Entstehung einer weiteren Proteinuntereinheit mit dem Molekulargewicht 177 000 (Komponente C) eingedämmt werden. Die Verminderung dieser Komponente hatte die simultane Zunahme der Komponente A zur Folge. Daraus zogen SCHWEIZER et al den Schluß, daß beim Zellaufschluß freigesetzte und mit PMSF hemmbare Proteasen im Verlauf der Enzymenreicherung Peptidbindungen des

Multienzymkomplexes spalten, dessen Quartärstruktur jedoch erhalten bleibt.

Die Befunde von SCHWEIZER et al (76) konnten wir bestätigen. Wir reicherten Fettsäuresynthetase unter Zusatz von PMSF an. (Zur Anreicherung vgl. S.80). Die SDS-Elektrophoresen dieser Enzympräparate zeigten im wesentlichen zwei Banden (Abb. 43). (Für die Durchführung der SDS-Elektrophorese danken wir F. WIELAND).

Abb. 43: SDS-Elektrophorese
von SDS-gespaltener
Fettsäuresynthetase.
Ausführung nach (76),
(s.S. 79).
Es wurden 10% Protein
aufgesetzt.
Feldstärke: 1 V/cm
Laufzeit: 21 h



Zur Untersuchung von Änderungen im α -helikalen Bereich nach Spaltversuchen bietet sich die Messung des Circular dichroismus an. Links- und rechtspolarisiertes Licht erfährt beim Durchgang durch optisch aktive Medien verschieden starke Ablenkungen. Die Meßgröße des Circular dichroismus stellt die Differenz der Ablenkungen dar, und ermöglicht es, den Anteil der optisch aktiven α -helikalen Bereiche in Proteinen abzuschätzen. Abb. 44 zeigt den Vergleich des Circular dichroismus der nativen Fettsäuresynthetase mit dem des SDS-behandelten Enzymes^{*)}. Es ist die Differenz der Drehung in Grad gegen die Wellenlänge aufgetragen. Beide Kurven zeigen den für α -helikale Strukturen typischen Verlauf.

*)

Für die Hilfestellung bei der Aufnahme der Spektren und die Diskussion der erhaltenen Meßdaten danken wir Herrn Dr. Bode, MPI für Biochemie.

Die Elliptizität ist zwar beim SDS-gespaltenen Enzym etwas vermindert, aber es läßt sich feststellen, daß auch das gespaltene Enzym noch die Merkmale einer geordneten Struktur trägt.

Im Gegensatz zu anderen Spaltmethoden (77, vgl. auch 78) kann die Carrier Protein - Komponente des Multienzymkomplexes mit SDS nicht abgespalten werden. Wie die Experimente von SCHWEIFZER et al (76) zeigen, bleibt dieser Bestandteil während der SDS-Elektrophorese mit der Komponente A verbunden. Das SDS-behandelte Enzym liegt in wenig aufgefalteter Struktur vor, es ist also denkbar,

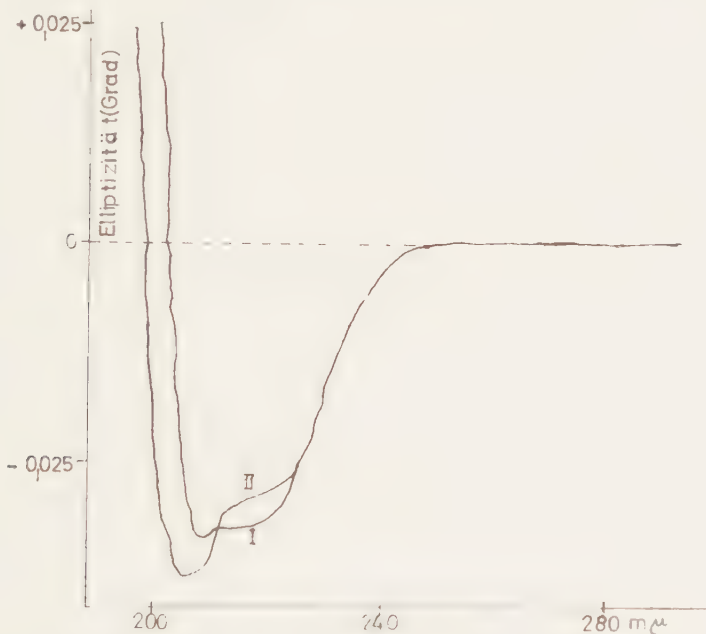


Abb. 44: Circulardichroismus von nativer (I) und SDS-gespaltenen FSS (II).*) $T = 25^{\circ}\text{C}$, Schichttiefe 1 cm, 0,78 mg FSS. Spaltung nach (76) (s.S. 79), jedoch ohne Thiol-Zusatz.

*) Der α -helikale Anteil kann grob abgeschätzt werden, wenn die Meßdaten bei 220 mμ mit den in der Literatur angegebenen für synthetische Polypeptide, die 100 bzw. 0% α -helikal oder geknäuelte vorliegen, verglichen werden. Nach (79) ergibt sich 19,5 bzw. 19%, nach (80), 16,5 bzw. 16% α -helikaler Anteil für natives bzw. SDS-gespaltenes Enzym.

daß ACP nicht freigegeben wird. Genetische Untersuchungen von SCHWEIZER sprechen allerdings dafür, daß das ACP kovalent in der Komponente A verankert ist (vgl. S.68).

Die Reaktivierung des mit allen genannten Agenzien zerlegten Enzyms zum aktiven Multienzymkomplex ist bisher nicht gelungen. Eine Spaltmethode, die die reversible Dissoziation in Untereinheiten ermöglicht, wurde von SUMPER et al (36,82) beschrieben.

Durch zwei- bis dreimaliges Einfrieren und Auftauen einer Fettsäuresynthetaselösung, welche 1 M an LiCl oder NaCl war, konnte der Enzymkomplex in Untereinheiten zerlegt werden. In der analytischen Ultrazentrifuge ließen sich langsamer sedimentierende Enzymspezies erkennen und das in der Diskelektrophorese gefundene heterogene Elektrophoresemuster unterschied sich von nativer Fettsäuresynthetase, welche als einheitliche Bande nachgewiesen wird. Das gespaltene System war nicht mehr fähig, Fettsäuren zu synthetisieren. Die Aktivität der 3-Ketoacylreduktase war ebenfalls auf Null abgesunken. Wenn die Ionenstärke verringert wurde, bildete sich die Struktur des Multienzymkomplexes zurück. Gleichzeitig konnten die beiden Aktivitäten teilweise reaktiviert werden.

Abb. 45 zeigt die Elektrophoresemuster des gespaltenen Systems nach der Diskelektrophorese. Verschiedene Enzympräparate ergaben gleiche Spaltmuster, Verschiebungen in der Intensität der einzelnen Proteinbanden traten zwar auf, waren jedoch unbedeutend.

Die Spaltung des Enzymkomplexes mit LiCl und die anschließende Behandlung des Spaltansatzes (nach Entsalzung, s. S. 82) mit SDS ergab Produkte, welche sich in der SDS-Gelelektrophorese nicht von den Untereinheiten unterschieden, die durch ausschließliche SDS-Spaltung erhalten wurden.

Die Spaltung mit LiCl führt also nicht zu Untereinheiten, welche ein geringeres Molekulargewicht haben, als die durch die anderen Spaltagenzien erhaltenen. Das Verhalten der Spaltstücke in der analytischen Ultrazentrifuge wird im folgenden beschrieben.

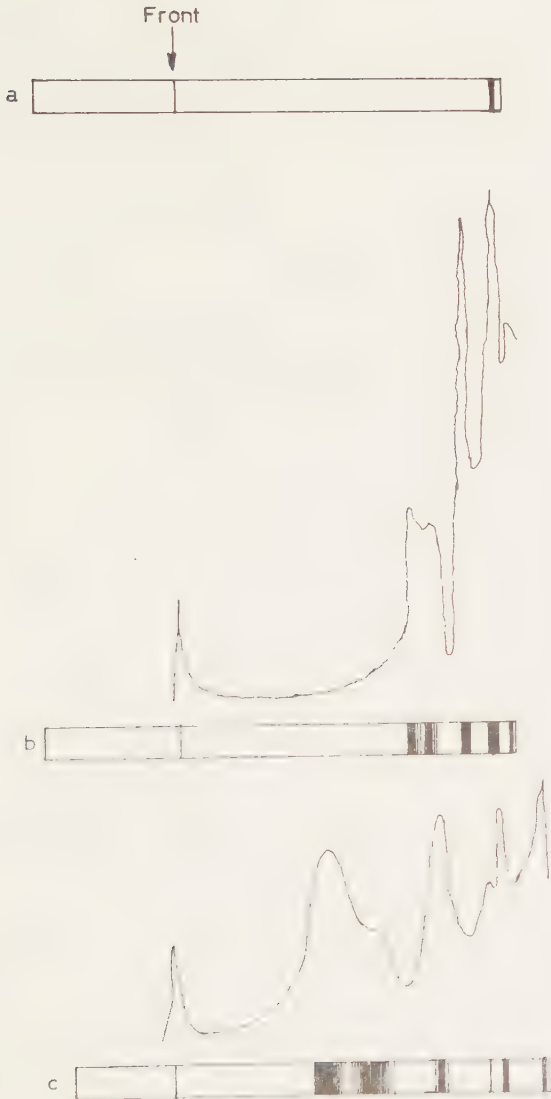


Abb. 45: Diskelektrophoresen in 4%igem Acrylamidgel, System A u. B
(a): native FSS, System "A", (b): LiCl-gespaltene FSS, System "A", (c) LiCl-gespaltene FSS, System "B".
(Durchführung s. S. 79)

Zur besseren Veranschaulichung der Spaltmuster sind die Densitogramme (T bei $\lambda = 546 \text{ m}\mu$) beigelegt.

2. Untersuchungen in der analytischen Ultrazentrifuge ^{*)}

a) Bestimmung der Sedimentationskonstanten des nativen Enzymes.

Es wurde ein Sedimentationslauf bei 44000 UpM durchgeführt (20°C). (FSS in 0,1 M KPO_4 , pH = 6,5, 10^{-3}M an Dithiothreitol gelöst. Optische Dichte (280 m μ): 0,56)

Die Abhängigkeit der Sedimentation von der Zeit ist in Abb. 46 aufgetragen.

Die nach (83) berechnete Sedimentationskonstante beträgt

$$S_{\text{app}} = 37,2 \quad (S_{20,w} \text{ ca. } 39\text{S})$$

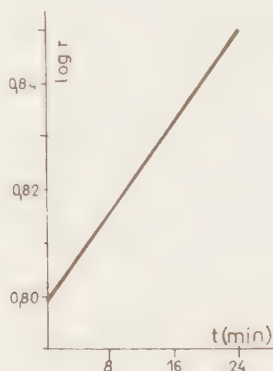


Abb. 46: Es ist der logarithmierte Abstand der Protein/Puffergrenze vom Rotationszentrum gegen die Zeit aufgetragen.

b) Molekulargewichtsbestimmung des nativen Enzymes

Es wurde ein Gleichgewichtslauf bei 2200 UpM (20,0°C) durchgeführt. (FSS in 0,1 M KPO_4 , pH = 6,5, 10^{-3}M an Dithiothreitol gelöst. Optische Dichte (280 m μ): 0,6). Nach 64 Stunden wurde das Sedimentationsgleichgewicht des Enzymes an Hand der Absorption bei 280 m μ bestimmt (Abb. 47). Die graphische Auswertung nach (83) gibt Abb. 48 wieder.

^{*)} Wir sind Herrn Dr. Prieß, MPI für Biochemie, für die Durchführung der Messungen und die Diskussion der Meßergebnisse zu großem Dank verpflichtet.

Die Messungen wurden in der analytischen Ultrazentrifuge Beckman, Modell E mit Scanner-Optik durchgeführt (Rotor AnH).

Das Molekulargewicht errechnet sich nach (83) zu $M = 2,3 \cdot 10^6$. Dieses Ergebnis stimmt mit dem früher von LYNEN und LORCH (82) bestimmten Wert überein.

Abb. 47: Proteinverteilung in der Meßzelle nach Erreichen des Sedimentationsgleichgewichts.

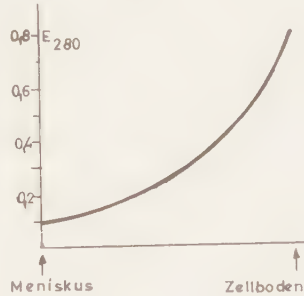
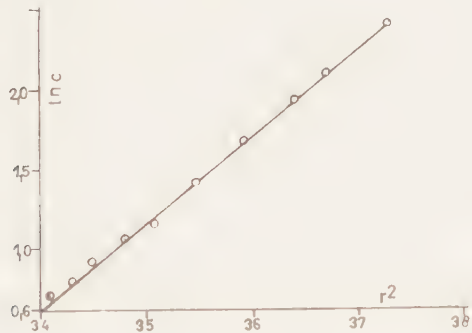


Abb. 48 Auswertung von Abb. 47 nach (83).



c) Bestimmung der Sedimentationskonstanten des LiCl-gespaltenen Enzymes.

Es wurde ein Sedimentationslauf bei 60000 UpM durchgeführt ($20,0^\circ\text{C}$) (Protein in 0,1 M Tris/HCl, pH = 7,5, 1M an LiCl, 10^{-3}M an Dithiothreitol gelöst. Optische Dichte (280 $\text{m}\mu$): 0,5) Die Sedimentation wurde an Hand der optischen Dichte bei 280 $\text{m}\mu$ verfolgt, acht Minuten nach Erreichen der Drehzahl 60000 UpM verhielt sich das heterogene Proteingemisch wie in Abb. 49 aufgezeichnet. Die Abhängigkeit der Sedimentation bei am lang-samsten wanderndes Proteinspezies (Stufe in Abb. 49) von der Zeit ist in Abb. 50 aufgetragen.

Wegen der Heterogenität der Spaltprodukte ist keine sehr genaue Bestimmung der Sedimentationskonstanten möglich. Sie beträgt ungefähr $S_{app} = 6,8$. Mit Berücksichtigung der Dichte und Viskosität des Puffers ergibt sich etwa $S_{20,w} = 8,9$.

Dieser Wert entspricht einem Molekulargewicht in der Größenordnung 180000, wenn globuläre Proteine angenommen werden. Außerdem liegt im Spaltgemisch noch etwa 40% schneller sedimentierendes Material vor (bis etwa 20 S). Die Spaltung führt also zu einem Gemisch von Untereinheiten verschiedenen Molekulargewichts. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen der Diskelektrophorese, mittels der das Spaltgemisch in mehrere Unterheiten aufgetrennt werden konnte. Durch Dichtegradientenzentrifugation (SUMPER, 81) konnte bereits auf ein Molekulargewicht ähnlicher Größenordnung geschlossen werden. Die Untereinheiten wanderten als einheitliche Bande, ähnlich wie das zugesetzte Referenzenzym Katalase, entsprechend einem Molekulargewicht 200000-250000.

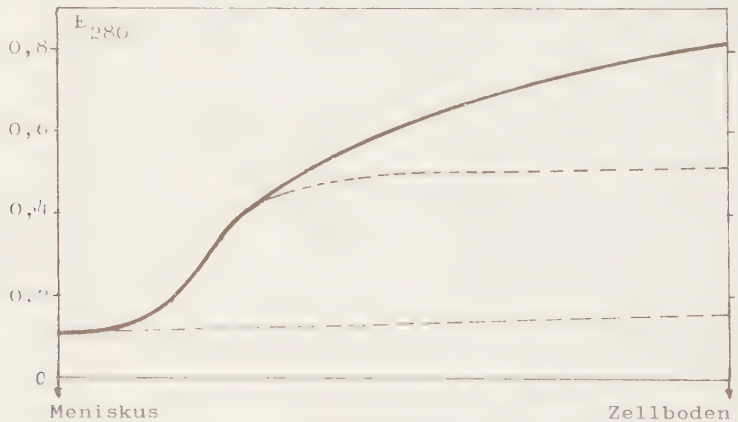
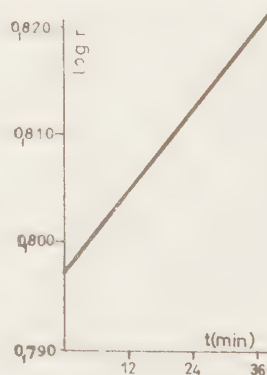


Abb. 49: (oben)

Proteinverteilung in der Meßzelle, acht Minuten nach Erreichen der Drehzahl 60000.

Abb. 50: (rechts)

wie Abb. 46, jedoch LiCl-gespaltenes Enzym.



Das Ergebnis der LiCl-Spaltung könnte so interpretiert werden, daß der Fettsäuresynthetasekomplex aus einer Anzahl verschiedener, ungleich großer Untereinheiten zusammengesetzt ist.

Die Ergebnisse der Spaltung mit den anderen Agenzien, insbesondere mit SDS, sprechen aber eher dafür, daß die Fettsäuresynthetase aus zwölf Untereinheiten von ähnlichem Molekulargewicht aufgebaut ist, von denen jeweils sechs identisch sind.

(Ein Mol FSS enthält möglicherweise sechs Mole 4'-Phosphopantethein (19,20) und sechs Mole FMN (24)).

Die LiCl-Spaltung würde demnach zu den kleinsten Untereinheiten A und B, aber auch zu höheren Aggregaten, etwa (AB) , $(AB)_m$, $(AB)_n$, führen.

Es ist bemerkenswert, daß das Elektrophoresemuster des LiCl-ge-spaltene Systems keine Änderung erfährt, wenn der Spaltansatz öfter eingefroren wird. Wenn das System statt dreimal siebenmal eingefroren wurde, war im Spaltmuster einer entsprechend Abb. 45 durchgeführten Diskelektrophorese keine Änderung festzustellen. Möglicherweise sind also die Untereinheiten im nativen Komplex mit unterschiedlich starken nicht-kovalenten Kräften aneinander gebunden.

4. Die enzymatische Aktivität des mit LiCl- oder Natriumcyanid-ge-spaltene Enzymkomplexes.

a) Reaktivierungsparameter

Die Fettsäuresynthese und die Teilreaktion der 3-Ketoacylreduktase werden vom lithiumchloridgespaltenen System nicht katalysiert. Wenn die Ionenstärke verringert wird, dann reaggregieren die Enzymkomponenten wieder zum einheitlichen Multienzymkomplex. Um die Aktivität der Gesamtreaktion wiederzugewinnen, müssen Mercaptane zugesetzt werden (36,81), um oxidierte Enzym-SH-Gruppen zu reduzieren. Die Bedeutung der Mercaptane wird durch Abb. 51 demonstriert.

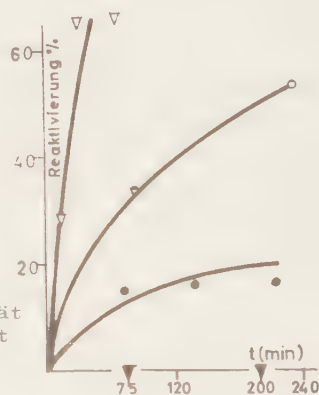
Ein Enzymansatz wurde ohne Mercaptanzusatz gespalten, hierauf sechs Stunden bei 0°C stehen gelassen und dann zur Reaktivierung angesetzt.

Ohne Mercaptanzusatz konnte die Gesamtaktivität nicht zurück-
erhalten werden, mit Cystein war eine teilweise, und mit
Dithiothreit, einem potenten Reduktionsmittel (84), eine beträcht-
liche Reaktivierung der Gesamtaktivität möglich. Wenn dem Ansatz
vor der Spaltung Dithiothreit zugefügt wurde, dann konnten bis zu
80% der ursprünglich vorhandenen Gesamtaktivität zurückerhalten
werden. Im Gegensatz zur Gesamtreaktion kann die Teilaktivität
der ersten Reduktion auch ohne Thiolzusatz reaktiviert werden
(Abb. 51). Diese Beobachtung stimmt mit Experimenten überein, die
ergeben haben, daß diese Teilaktivität durch Schwefelgifte nicht
hemmbar ist (25, 36).

Abb. 51:

Reaktivierung der Gesamtaktivität und
der Aktivität der ersten Reduktion.
Durchführung der Spaltung s. S. 88.
Der gespaltene Ansatz ist vor der
Reaktivierung ohne Thiolzusatz 6 Stdn.
bei 0°C aufbewahrt worden. Aliquote des
gespaltenen Ansatzes wurden fünffach mit
0,1 M KPO_4 , pH = 7,5 verdünnt, welcher
(●) 50 mM an Cystein,
(○) 50 mM an DTT und
(▼) ohne Mercaptanzusatz war und mit
Aliquoten die Rückkehr der Gesamtaktivität
verfolgt. Die Reaktivierung der Aktivität
der ersten Reduktion (▼) erfolgte analog
ohne Mercaptanzusatz.

Reaktivierungstemperatur: 20°C.

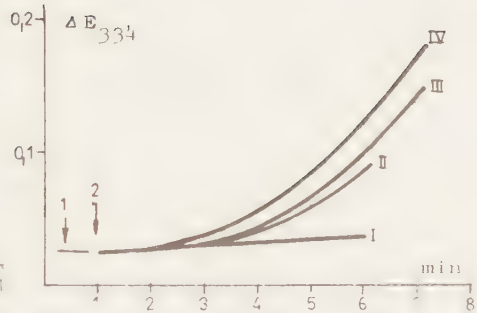


Die Reaktivierungsgeschwindigkeit der beiden Aktivitäten ist ab-
hängig vom pH und von der Art des verwendeten Puffers. In Abb. 52
ist der Reaktivierungsverlauf für die Gesamtreaktion und in Abb. 53
für die erste Reduktion wiedergegeben. Die Bestimmungen erfolgten
im jeweiligen optischen Aktivitätstest.

Die Reaktivierung beider Aktivitäten erfolgt mit Tris-Puffer
pH = 7,5 langsamer als in den Phosphatpuffern.

Im KPO_4 -Puffer pH = 7,5 reaktiviert die Gesamtreaktion rascher als
bei pH = 5,5. Im Gegensatz dazu erscheint die Aktivität der
3-Ketoacylreduktase bei pH = 5,5 schneller als bei pH = 7,5, die
Teilaktivität kann also weitgehend unabhängig von der Gesamt-
aktivität reaktiviert werden.

Abb. 52: Reaktivierung der gespaltenen FSS im optischen Testsystem der Gesamtreaktion. Die Ansätze enthielten zusätzlich $10^{-3} M$ DTT und waren $0,1 M$ an (I) Tris/HCl, pH = 7,5, (II) KPO_4 pH = 5,5, (III) KPO_4 pH = 6,5, (IV) KPO_4 pH = 7,5.



Pfeil 1: Zugabe des LiCl-gespaltenen Enzymes (102%), Pfeil 2: Start der Reaktion durch Malonyl-CoA.

Die unterschiedliche spezifische Aktivität der FSS in den verschiedenen Puffersystemen (s. Tab. 5) ist in der Abb. bereits berücksichtigt.

Puffer/pH	Gesamtaktivität	3-Ketoacylreduktase-aktivität
$KPO_4/6,5$	100	76
$KPO_4/7,5$	87	100
$KPO_4/5,5$	29	69
Tris/HCl/7,5	51	69

Tab. 5: Ergänzung zu Abb. 52 und 53: Relative Aktivitäten der FSS in den verschiedenen Reaktivierungspuffern.

Abb. 53: Reaktivierung der gespaltenen FSS im optischen Testsystem der 3-Ketoacylreduktase.

Die Ansätze waren:

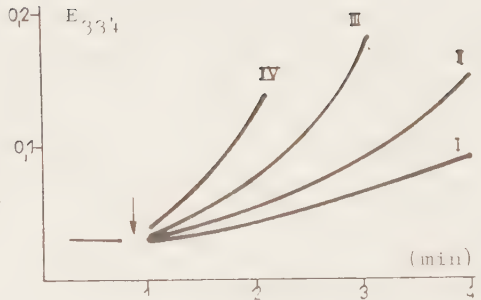
0,1 M an (I) Tris/
HCL pH = 7,5, (II)

KPO₄ pH = 7,5, (III)

KPO₄ pH = 6,5, (IV)

KPO₄ pH = 5,5. Start der Modellreaktion durch Zugabe (Pfeil) von 106% FSS.

Die unterschiedliche spezifische Aktivität der FSS in den verschiedenen Puffersystemen (s. Tab. 5) ist in der Abb. bereits berücksichtigt.



b) Native und gespaltene Synthetase: Vergleich der Teilaktivitäten.

Die Schädigung der Quartärstruktur bei der Lithiumchloridspaltung ließ erwarten, daß die Aktivitäten der Teilenzyme, die an die intakte Struktur des Multienzymkomplexes gebunden sind, im gespaltenen System verschwunden sind. Die übrigen Teilaktivitäten sollten nur dann beeinträchtigt worden sein, wenn durch Änderungen in der Tertiärstruktur die Konformationen der aktiven Zentren verändert werden. Die katalytischen Fähigkeiten des gespaltenen und des nativen Enzymsystems können den Abb. 54 bis 57 entnommen werden.

60% der ursprünglich vorhandenen Malonyltransferaseaktivität bleiben im gespaltenen System erhalten. Der Meßwert ist unabhängig von der Reaktionsdauer der enzymatischen Übertragungsreaktion (2-4 min) und kommt folglich nicht durch eine teilweise Reaktivierung der Transferase während der Meßreaktion zustande.

Die Acetyltransferase bleibt im gespaltenen System vollkommen erhalten, die Aktivität der 3-Hydroxyacyldehydratase und der 2,3 - Enoylhydratase nimmt geringfügig um etwa 5% ab. Die Teilreaktion der Enoylreduktase, gemessen mit dem Substratmodell S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin ist im gespaltenen System verschwunden.

Die Aktivitätsabnahme der Enoylreduktase war zu erwarten, denn die Spaltung des Enzymkomplexes mit Lithiumchlorid bedingt auch eine weitgehende Abspaltung des FMN, welches in diesem Teilschritt Coferment ist.

Dies läßt sich erkennen, wenn man die Enzymlösung im langwelligen ultravioletten Licht betrachtet. Die gelbe Fluoreszenz des am nativen Enzym gebundenen FMN schlägt in die grüngelbe Fluoreszenz des freien FMN um, wenn das Enzym gespalten worden ist. Durch Sephadex G-25-Chromatographie erhält man zwei Fraktionen: Die niedermolekulare Bestandteile enthaltende Fraktion fluoresziert intensiv wie freies FMN, während die Fraktion, welche das gespaltene Enzym enthält, noch schwach gelb fluoresziert.

Sobald das gespaltene Enzymsystem jedoch den Reaktivierungsbedingungen ausgesetzt wird, kehrt die Aktivität der Enoylreduktase

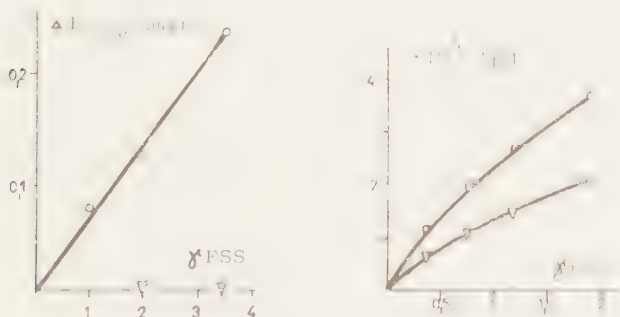


Abb. 54: (links) Gesamtaktivität
(rechts) Malonyltransferase
0,06 μ Mol (62500 IpM) Mal-CoA, 0,6 μ Mol Pant
Reaktionszeit 4 Min.

Abb. 54 bis 57: Die Aktivität der nativen (o—o) und der mit LiCl gespaltenen (▲—▲) FSS.
Durchführung der Spaltung S. 88

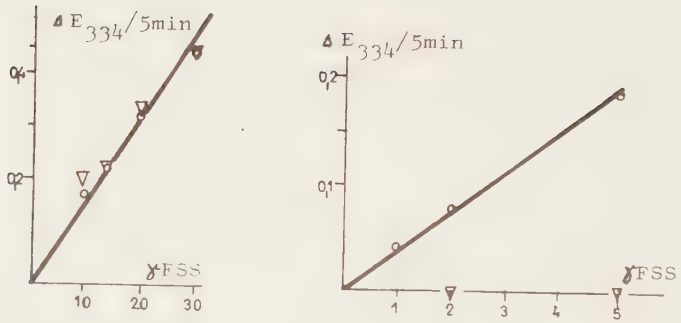


Abb. 55: (links) Acetyltransferase, optischer Test
(rechts) 3-Ketoacylreduktase

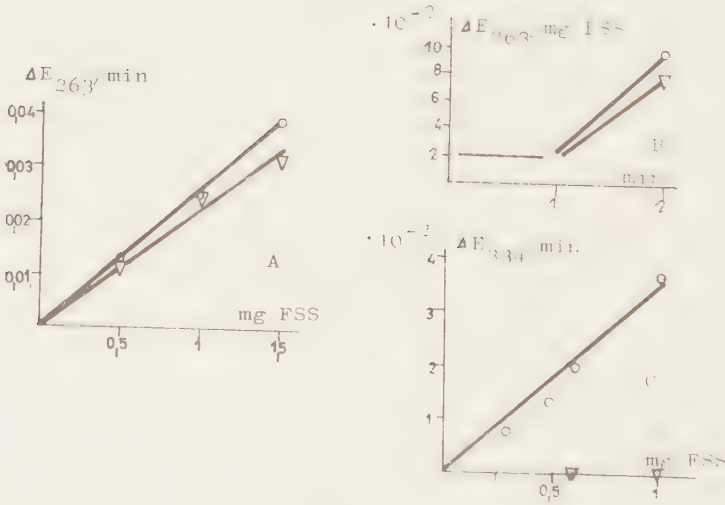


Abb. 56: (A) 3-Hydroxyacyldehydratase
(B) 2,3-Enoylhydratase
(C) 2,3-Enoylreduktase

Abb. 54 bis 57: Die Aktivitäten der nativen (o—o) und der mit LiCl gespaltenen (◄—◄) FSS.
Durchführung der Spaltung s. S. 88

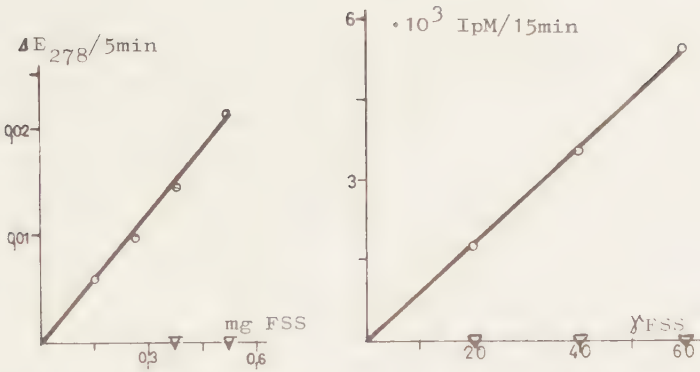


Abb. 57: Aktivität des Kondensierenden Teilenzymes.
 (links) Triacetsäurelactonbildung
 (rechts) Carboxylierende Spaltung.
 (C-14-CO₂-Einbau)

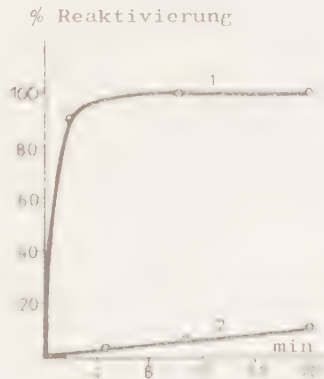
innerhalb von drei bis vier Minuten zurück (Abb. 58).

Während dieser kurzen Zeit hat sich die Gesamtaktivität erst bis zu etwa 5% der Ausgangsaktivität zurückgebildet. Das Verschwinden dieser Teilaktivität nach der LiCl-Spaltung dürfte somit nicht auf Veränderungen in der Quartärstruktur zurückzuführen sein.

Abb. 58: Reaktivierung der Gesamtaktivität und der Aktivität der 2,3-Enoylreduktase.

Kurve 1: 2,3 Enoylreduktase
 Kurve 2: Gesamtaktivität

Ausführung s. S. 86



Wahrscheinlicher ist es, daß das Coferment unter den Bedingungen der Enzymspaltung vom Teilenzym gelöst wird und eine Umkehrung dieses Vorganges erst bei der höheren Temperatur des Reaktivierungsansatzes erfolgt. Rasche Änderungen in der Tertiärstruktur der Enoylreduktase könnten dabei eine Rolle spielen.

Die Aktivität der 3-Ketoacylreduktase ist im gespaltenen System auf Null abgesunken (36,81) und (Abb. 55) und das gleiche Ergebnis stellten wir für das Kondensierende Teilenzym fest, nachdem wir seine Aktivität einerseits mit dem Substratmodell (Gl. 8, s. 19) bestimmt und andererseits die Triacetsäurelactonbildung optisch verfolgt hatten (Abb. 56).

c) Zusammenfassung der Befunde

Die Resultate der Aktivitätsbestimmung sind in Tab. 5 zusammengefaßt.

	Restaktivität (native FSS = 100)
Acetyltransferase	100
Malonyltransferase	100
Kondensation (C-14-CO ₂ -Einbau) (FAL)	0
3-Ketoacylreduktase	0
2,3-Enoylhydratase	0
3-Hydroxyacyldehydratase	0
2,3-Enoylreduktase	100 (0)
Gesamtaktivität	0

Tab. 6: Die Teilaktivitäten der gespaltenen FSS.
(Zusammenfassung der Abb. 54 bis 57).

Aus den gemessenen Daten folgt, daß sich die Aktivitäten der Teilenzyme Acetyltransferase, Enoylreduktase und Hydroxyacyldehydratase beim Spaltvorgang nicht oder kaum verändern. Die räumliche Anordnung der katalytischen Zentren dieser Teilenzyme bleibt also in den Untereinheiten weitgehend erhalten. Die

Spaltung bewirkt aber offenbar auch Veränderungen in der Struktur der Untereinheiten, denn die Aktivität der Malonyltransferase ist merklich vermindert.

Das gespaltene System ist im Aktivitätstest der 3-Ketoacylreduktase und der Kondensation inaktiv, weder die Untereinheiten A und B noch die bei der Spaltmethode auftretenden Assoziate $(AB)_x$ katalysieren diese Teilfunktionen. Offenbar werden erst bei der Rückbildung des Multienzymkomplexes Strukturen ausgebildet, die zur enzymatischen Katalyse dieser Reaktionen und damit auch der Fettsäuresynthese befähigt sind, oder die Tertiärstruktur der Teilenzyme ist im gespaltenen System so umgebildet, daß keine Katalyse erfolgen kann.

d) Das Verhalten der enzymatischen Aktivitäten bei der Reaktivierung der gespaltenen Fettsäuresynthetase.

Abb. 59 zeigt die Reaktivierungskinetik der Gesamtaktivität in Relation zur 3-Ketoacylreduktase im KPO_4 -Puffer, pH = 7,5.

In Übereinstimmung mit (81) fanden wir, daß die Aktivität der Teilreaktion schneller zurückkehrt, als die Aktivität der Gesamtreaktion.

Die Teilaktivität des Kondensierenden Enzymes sollte entweder ebenfalls schneller zurückkehren als die Aktivität der Gesamtreaktion, oder es sollte sich eine synchron mit der Aktivitätszunahme der Gesamtreaktion verlaufende Kinetik ergeben.

Die erste Möglichkeit war zu erwarten, wenn der langsamste Schritt in der Reaktivierung der Gesamtaktivität durch die Reaggregation von räumlich getrennten Untereinheiten bestimmt wird, deren Teilaktivitäten bereits alle zurückgebildet sind. Die andere Möglichkeit sollte auftreten, wenn der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Reaktivierung durch die Kondensierende Teilaktivität selbst bestimmt wird. Dabei könnten Konformationsveränderungen im aktiven Zentrum eine Rolle spielen oder wieder die Reaggregation von Komponenten, welche die für die Aktivitätsbestimmung nötigen Teilenzyme tragen. (Neben den Wirkzentren des Kondensierenden Teilenzymes

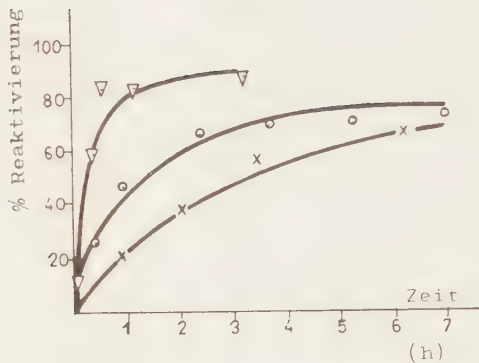


Abb. 59:
 Reaktivierung von LiCl-gespal-
 tener FSS
 (Ausführung s. S.)
 Kurve 1: Kondensierende Aktivität
 (TAL-Bildung)
 Kurve 2: Gesamtaktivität
 Kurve 3: 3-Ketoacylreduktase

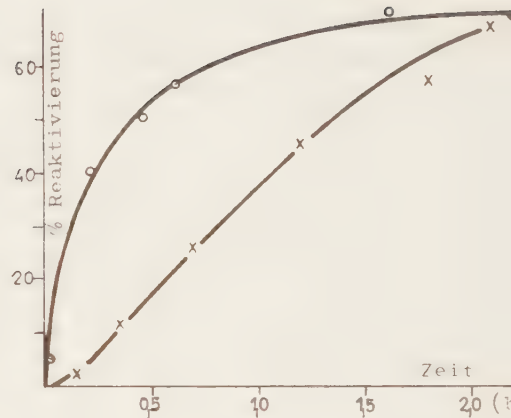


Abb. 60:
 Reaktivierung von LiCl-gespal-
 tener FSS
 (Ausführung s. S.)
 Kurve 1: Gesamtaktivität
 Kurve 2: Kondensierende Aktivität
 (Spaltung unter
 Carboxylierung)

werden für die Triacetsäurelactonbildung noch Acetyl- und Malonyl-
 transferase und für die "Spaltung unter Carboxylierung" noch die
 Acetyltransferase benötigt).

Die Messungen zeigten, daß der für die Gesamtaktivität erreichbare
 Reaktivierungsgrad (70-80%) offenbar durch die Kondensierende Teil-
 aktivität bestimmt wird. Die Aktivität der Triacetsäurelactonbild-
 ung und die der Modellreaktion (Gl. 8, "Spaltung unter Carboxyl-
 ierung") kehren zum gleichen Plateau zurück wie die Gesamtaktivität
 (Abb. 59 und 60).

Die Fähigkeit zur Fettsäuresynthese wird allerdings rascher reaktiv-
 iert als die beiden Teilreaktionen. Die Fettsäuresynthese wird also
 bereits katalysiert, wenn sich die katalytisch wirksamen Elemente
 des Multienzymkomplexes noch nicht im Zustand der bestmöglichen
 Orientierung befinden:

Die enzymatisch katalysierte Triacetsäurelactonbildung enthält im
 Gegensatz zur Fettsäuresynthesesequenz vermutlich (47) einen
 Schritt, bei dem der Acetoacetylrest von der zentralen auf die

periphere SH-Gruppe übertragen wird. Es ist denkbar, daß dieser Schritt oder die folgende Kondensation mit dem auf die zentrale SH-Gruppe übertragenen Malonylrest zum Triacetsäurederivat im noch nicht maximal reaggregierten Wirkzentrum des Kondensierenden Teilenzymes langsamer erfolgt als die Kondensation zum Acetoacetylrest.

Bei der Modellreaktion erfolgt die nicht-kovalente Bindung des Substratmodells S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin am aktiven Zentrum des Kondensierenden Teilenzymes offenbar schlechter, wenn der Multi-enzymkomplex noch nicht maximal rekoordiniert ist. Dessen katalytische Umsetzung erfolgt deshalb langsamer, während die enzymgebundenen Zwischenstufen bereits rascher umgesetzt werden.

Die Anzahl der Mole a_0 der Untereinheiten, die bei der LiCl-Spaltung pro Mol Fettsäuresynthetase entstehen, ist zwar nicht bekannt, aber sie ist jedenfalls proportional zur eingesetzten Fettsäuresynthetasemenge, denn man kann erwarten, daß die Untereinheiten in einem stöchiometrisch sinnvollen Zusammenhang mit dem nativen

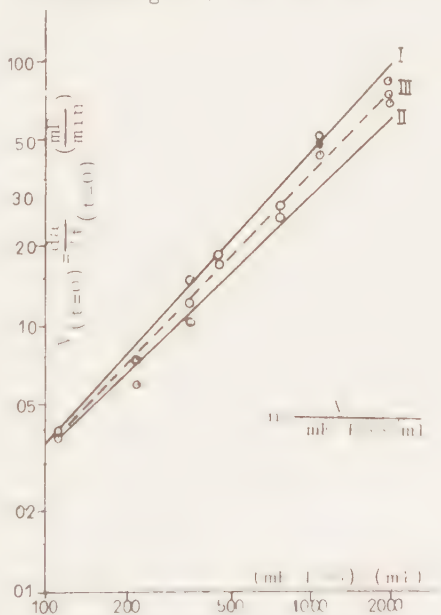
Abb. 61:

Reaktivierung der 3-Ketoacylreduktase (25°). Bestimmung der Reaktionsordnung.

Kurve III zeigt die Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeit der Reaktivierung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration in doppelt logarithmischer Darstellung.

Durchführung s. S. 88

Die Meßwerte wurden statistisch nach (85) behandelt. Die beiden Regressionsgeraden I und II wurden nach dem Verfahren der Methode der kleinsten Quadrate berechnet. Das Bestimmtheitsmaß beträgt 0,96, d.h. 96% der Punkte erklären den Verlauf der Funktion.



Komplex stehen. Die Reaktionsordnung der Reaktivierung ist bestimmbar nach Gl. 13a, wenn die Reaktivierungsgeschwindigkeit $\frac{da}{dt}$ am Beginn der Reaktivierung als Funktion der Enzymkonzentration gemessen wird. Werden die Werte doppeltlogarithmisch gemäß Gl. 13b aufgetragen, entspricht die Steigung der resultierenden Geraden der Reaktionsordnung n.

$$\frac{da}{dt} = k a^n$$

$$\ln\left(\frac{da}{dt}\right) = \ln k + n \ln a_0$$

Gl. 13a

b

Wir verfolgten die Reaktivierung der 3-Ketoacylreduktase im Experiment der Abb. 61.

Maß für die eingesetzte Menge des inaktiven Teilenzymes a_0 war die Aktivität vor der Spaltung. Die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktivierung wurde gemessen, indem die Rückkehr der Aktivität zeitlich verfolgt wurde.

Im Experiment fanden wir eine Reaktionsordnung von $n = 1,0$ und eine Geschwindigkeitskonstante $k = 0,40$ (1/min) (Abb. 61). Zwei weitere Experimente ergaben $n = 1,07$, $k = 0,58$ und $n = 1,07$, $k = 0,52$.

Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Reaktivierung der 3-Ketoacylreduktase aus Konformationsveränderungen in der Tertiärstruktur der kleinsten Untereinheit A (bzw. B) oder der höher assoziierten Enzymverbände $(AB)_x$ besteht und daß die Untereinheiten nicht miteinander reagieren müssen, um das aktive Zentrum dieses Teilenzymes zurückzubilden. Der Verlust dieser Teilaktivität nach der LiCl-Spaltung ist also offenbar auf tiefgreifende Änderungen in der Tertiärstruktur des Teilenzymes zurückzuführen, und weniger in der Trennung des nativen Enzymkomplexes in die Komponenten begründet. Für die Reaktivierung der Gesamtaktivität ergab ein entsprechendes Experiment $n = 1,45$ und die Geschwindigkeitskonstante $k = 0,03$. Eine weitere Meßreihe ergab $n = 1,4$ und $k = 0,035$. Der Wert der Reaktionsordnung könnte so interpretiert werden, daß im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt Reaktivierungsprozesse

Abb. 62:

Reaktivierung der Gesamtaktivität (25°).

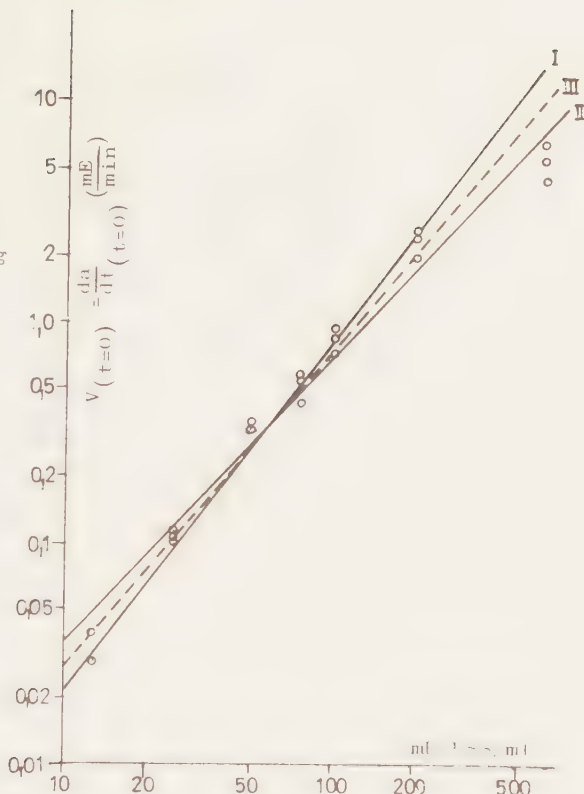
Bestimmung der Reaktionsordnung.

Auftragung der Werte analog Abb. 61.

Zur Durchführung s. S. 88.

Zur statistischen Behandlung der Meßwerte vgl. Legende d. Abb. 61.

Das Bestimmtheitsmaß ermittelte sich zu 0,86.



ablaufen, welche zum Teil erster und zum Teil zweiter Ordnung sind, und deren Geschwindigkeiten in der gleichen Größenordnung liegen. Da die Reaktivierung der 3-Ketoacylreduktase nach erster Ordnung verläuft, würde dann die Reaktivierung des Teilenzymes für die Kondensierende Aktivität nach zweiter Ordnung ablaufen. Dies könnte bedeuten, daß bei der Reaktivierung des Kondensierenden Teilenzymes ein Schritt beteiligt ist, der aus der Reassoziierung der nicht-identischen Untereinheiten A und B besteht. Die Reaktivierung könnte allerdings auch durch die Reaggregation von höheren und ungleich großen Assoziaten $(AB)_m$ und $(AB)_n$ bestimmt werden. Die Reaktivierung der Gesamtaktivität wird also durch die Reaktionsordnung klar definiert, eine Interpretation ist jedoch schwierig.

4. Zur präparativen Trennung der Spaltprodukte

Die kinetischen Messungen am gespaltenen Enzymkomplex erlaubten eine Reihe klarer Aussagen. Tiefere Einblicke in die Architektur des Multienzymkomplexes sind jedoch erst dann möglich, wenn die Untereinheiten in präparativem Maßstab voneinander getrennt und einzeln untersucht werden.

Die Techniken der Rohrzuckergradientenzentrifugation und der Filtration über Molekularsiebe (Sephadex) führten nicht zur Auftrennung in die einzelnen Spaltprodukte (36).

Das Ergebnis der analytischen Diskelektrophorese (Abb. 45) ließ erwarten, daß diese Methode Auftrennungen auch dann erlaubt, wenn sie in präparativem Maßstab durchgeführt wird.

Die aufgetrennten Proteinbanden können isoliert werden, wenn das Polyacrylamidgel mit einem Rohrzuckergradienten unterschichtet wird (86). Die aufgetrennten Proteine wandern in den Rohrzuckergradienten. Dort bleiben die Fraktionen stabil und können nach Beendigung des Experimentes bequem fraktioniert werden.

Technisch führten wir die präparative Diskelektrophorese durch, indem wir die Elektrofokussierausrüstung verwendeten. Einzelheiten können dem experimentellen Teil entnommen werden. Unsere Experimente in dieser Richtung sind noch nicht sehr weit gediehen, Abb. 63 demonstriert jedoch, daß dieses Verfahren prinzipiell geeignet ist, das komplexe Gemisch der Untereinheiten präparativ aufzutrennen.

Die Doppelbande, welche in der analytischen Diskelektrophorese am schnellsten wandert, wird im Rohrzuckergradienten als einheitlicher, scharfer Proteingipfel erhalten. Die analytische Disk-elektrophorese mit der Gipfelfraktion bestätigt die erfolgreiche Anreicherung des Spaltprodukts.

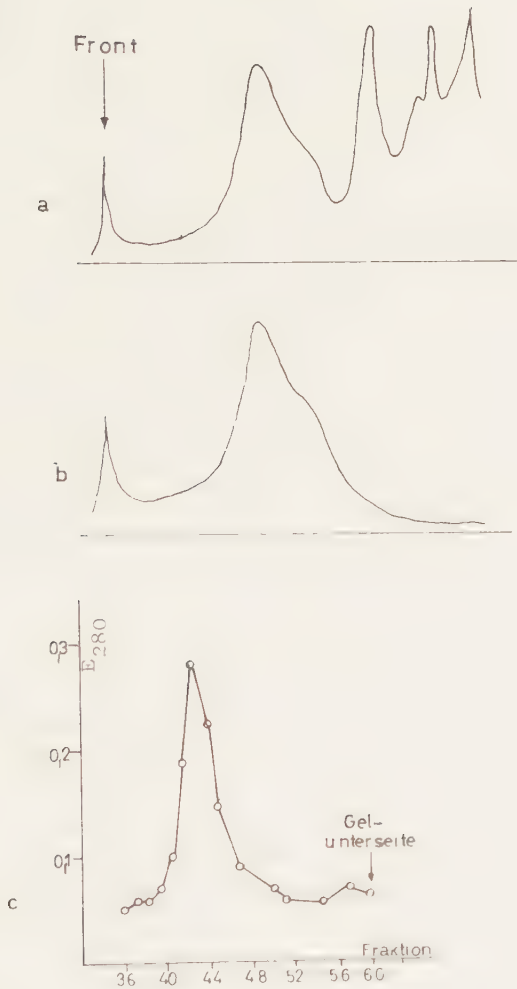


Abb. 63:
Vorversuch zur präparativen Trennung der Untereinheiten. Disk-
elektrophoresesysteme "B" (s. S. 79 + 89)

- (a) Densitogramm von LiCl-gepaltener FSS in der analytischen Disk-elektrophorese. (T bei $\lambda = 546 \text{ m}\mu$)
- (c) Proteinverteilung im Rohrzuckergradienten nach der präparativen Disk-elektrophorese.
- (b) Densitogramm der Fraktion Nr. 42 des Zuckergradienten in der analytischen Disk-elektrophorese. (T bei $\lambda = 546 \text{ m}\mu$)

5. Diskussion

Während die Fettsäuresynthetasen verschiedener Prokaryonten, z. B. das System aus E.coli (11,12,13) nur in Form der Einzelenzyme isoliert werden können, sind bisher alle Versuche, den Hefekomplex in die individuellen Enzymkomponenten zu spalten, erfolglos geblieben. Sämtliche Spaltexperimente führten zu Untereinheiten, die Molekulargewichte in der Größenordnung $2 \cdot 10^5$ hatten. Ein ähnliches Verhalten zeigen auch Fettsäuresynthetasen anderer höherer Organismen (11,12,13).

Neue Einblicke in die Struktur des Hefekomplexes ermöglichen genetische Untersuchungen an Hefemutanten, die in SCHWEIZERS Arbeitskreis durchgeführt worden sind. Diese Experimente zeigen, daß die Teilenzyme im Multienzymkomplex nicht als einzelne Polypeptide vorliegen, sondern daß die Untereinheiten aus zwei verschiedenen, multifunktionellen Polypeptidketten bestehen: SCHWEIZER et al (69,95,96,97) fanden zwei voneinander unabhängige Polycistrone am Genom der Hefe, die die beiden Polypeptidketten kodieren. Eines kodiert Enoylreduktase und Dehydratase, das andere 3-Ketoacylreduktase, Kondensierendes Enzym und Acyl-Carrier-Protein.

Die beiden Polypeptide wurden durch proteinchemische Experimente nachgewiesen. Durch SDS-Spaltung konnte der Multienzymkomplex in zwei verschiedene Untereinheiten vom Molekulargewicht ca. 180.000 aufgespalten werden (76). Die mit SDS erhaltenen Produkte sind enzymatisch inaktiv und konnten nicht zum aktiven Multienzymkomplex reaktiviert werden.

Im Gegensatz dazu kann das nach SUMPER et al (81) mit LiCl gespaltene System zum aktiven Enzymkomplex reaktiviert werden. Die Untersuchungen zur Molekulargewichtsbestimmung deuten darauf hin, daß auch durch diese Methode die kleinsten nichtidentischen Polypeptide erhalten werden.

Die Spaltung ist allerdings unvollständig. Das gespaltene System enthält noch höhere Aggregate.

Die Aktivitäten der Acetyltransferase, Malonyltransferase, Dehydratase und Enoylreduktase bleiben im gespaltenen Enzym völlig oder weitgehend erhalten. Wesentliche Konformationsänderungen in den

enzymatisch aktiven Zentren dieser Teilenzyme treten beim Dissoziationsprozeß also nicht auf.

Nach der präparativen Isolierung der Untereinheiten wird man diese Teilaktivitäten den entsprechenden Untereinheiten zuordnen können.

Das Kondensierende Enzym und die 3-Ketoacylreduktase sind inaktiv, die Aktivitäten bilden sich jedoch zurück, wenn der Enzymkomplex rekonstituiert und die Gesamtaktivität reaktiviert wird. Entweder ist beim Dissoziationsprozeß die Konformation der Tertiärstruktur in den aktiven Zentren verändert worden, oder diese Teilenzyme stellen höhere Anforderungen an die Organisation des Systems und sind erst dann aktiv, wenn sich spezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen des Multienzymkomplexes zurückgebildet haben. Erst durch definierte Reaktivierungsexperimente mit den einzelnen, voneinander getrennten Untereinheiten wird man klären können, wie diese Teilaktivitäten von der Struktur des Fettsäuresynthetase-komplexes abhängen.

D. Experimentelle Einzelheiten.

1. Geräte

Präparative Ultrazentrifugen Beckman Spinco

Modelle L 40, L 50, L 2-65B, L 3-40, L 3-50

Präparative Zentrifugen Servall RC-2 und RC-2B

Präparative Zentrifuge W. Stock Maschinenbau KG, Marburg

Tischzentrifuge Christ Superspeed Junior 1

Manton-Caulin-Homogenisator, G. Schröder, Lübeck-Schlutup

Gradientenpumpe Beckman Modell 141

Fraktions-Kollektor Radirac, LKB, Stockholm

Photometer Eppendorf, Netheler und Hinz, Hamburg

mit Philips-Kompensograph

Spektralphotometer Zeiss, Modell M 4 Q II

Spektralphotometer Cary Modell 14

Spektralphotometer Beckman DB-T mit Servogor-Schreiber

Durchflußphotometer Uvicord II, LKB, Stockholm

Kofler Heizmikroskop, C. Reichert AG, Wien

Dünnschichtscanner, Bertholt LB 2722 mit Dual Ratemeter-

Integrator LB 242 K

Flüssigkeits-Scintillationsspektrometer Packard Tri-Carb

Modell 314 und 544

Gleichspannungsgeräte Camag, Buchler, Hölzel

Isoelektrische Fokussierung-Apparatur für 110 ml, LKB, Stockholm

pH-Meter, Knick, Berlin, Typ 27 und Pusi, München, Typ 11/12

Gefriertrocknungsanlage Typ L2, WKF, Brandau

Mikroliterspritzen Hamilton, G. Schmidt, Hamburg

Glaselektroden Ingold, Frankfurt

Rotavapor "R", Büchi

Spektralphotometer Cary Modell 60

UV-Gerät zur Dünnschichtchromatographie, Bälz, Heilbronn

2. Handelsübliche Materialien.

Sofern nicht besonders vermerkt, wurden die Chemikalien und die Dünnschicht-Materialien von der Fa. E. Merck, Darmstadt, die Enzyme und Substrate von der Fa. C. F. Boehringer, Mannheim und die radioaktiv markierten Ausgangsverbindungen vom Radiochemical Centre, Amersham, England bezogen.

Sephadex (Pharmacia, Uppsala)

DEAE-52-Cellulose und Papiersorte 1 (Whatman)

Reagenzien für die Diskelektrophorese, DTT (Serva, Heidelberg)

Szintillatoren: PPO, Dime thyl-POPOP (Interchem, München)

Aluminiumoxid (Woelm, Eschwege)

DTNB, NÄM (Fluka, Buchs)

Diketen (Schuchardt, München)

SA vom Rind (Behringwerke, Marburg)

Ampholine (LKB, Stockholm)

Bäckerhefe (Scheibe u. Schertl, Oberkotzau)

Bierhefe wurde von der Löwenbräu AG, München gespendet.

3. Synthese von Substraten

a) N-Capryloylcysteamin-Derivate

N-Capryloylcysteamin und S-Malonyl-N-Capryloylcysteamin wurden nach (60) dargestellt.

S-(2-C-14)-Malonyl-N-Capryloylcysteamin wurde nach (60) dargestellt, die Vorschrift jedoch, um eine hohe spezifische Radioaktivität zu erhalten, wie folgt abgewandelt.

Im Reaktionskölbchen (Abb. 64a) befand sich 1ml Wasser, in welchem 9,85 μMol Natrium-2-C-14-Malonat (25,3 mc/mMol) gelöst war. Nach Zugabe von 73 μMol Malonsäure wurde mit 10 μl 3N HCl angesäuert, das Wasser bei Zimmertemperatur abgezogen und der Rückstand im

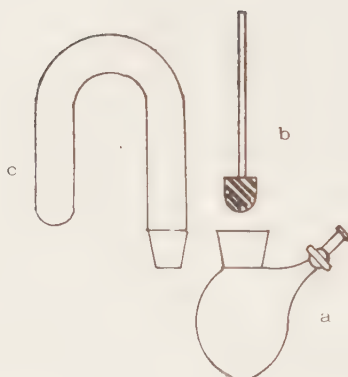


Abb. 24

Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Die radioaktive Malonsäure wurde dann in 1 ml peroxidfreiem Äther durch Kochen unter Rückfluß (Feuchtigkeit vermeiden!) gelöst und nach Zusatz von 20 μ l Thionylchlorid durch weiteres sechsständiges Kochen unter Rückfluß in Malonsäuremonochlorid übergeführt. Hierbei ist zu beachten, daß die Temperatur des Bades 46-48°C nicht übersteigt, da sonst leicht Verharzung eintreten kann.

Unter Vermeidung von Feuchtigkeitseinfluß wurde das Reaktionsgefäß verschlossen, und, bei der Temperatur einer Eis-Kochsalz-Mischung, das Lösungsmittel abgezogen. Um auch wirklich alles überschüssige Thionylchlorid zu entfernen, wurde das Gefäß erst nach weiterem zehnmütigem Vakuum bei Zimmertemperatur mit trockenem Stickstoff belüftet. Während ein leichter Strom getrockneten Stickstoffs das Kölbchen durchspülte, wurden ca. 20 mg N-Capryloylcysteamin zugegeben und mit dem Mikropistill (Abb. 64b) rasch und intensiv verrieben, wobei sich unter HCl -Entwicklung ein zähflüssiger Brei bildete. Nach Aufstecken des mit KOH gefüllten Verschlusses (Abb. 64c) und Anschluß einer Ölpumpe (KOH-Trockenrohr zwischengeschaltet) wurde das Produkt eine Stunde im Vakuum gehalten. Nach Aufnahme des Rückstandes in Kaliumhydrogencarbonatlösung (50 mg/ml) und Extraktion des

überschüssigen, unlöslichen N-Capryloylcysteamins mit peroxid-freiem Äther kann - nach Verblasen der Ätherreste- der Gehalt der Lösung bestimmt werden. Vier verschiedene Ansätze erbrachten Ausbeuten von 44,5, 47,5, 51 und 54%, bezogen auf Malonsäure. Die Lösungen wurden bei -15°C aufbewahrt, nachdem sie bis $\text{pH} = 4 - 5$ angesäuert worden waren.

b) Coenzym A-Derivate

Malonyl-CoA und 2-C-14-Malonyl-CoA wurden nach (60) dargestellt.

Das zur Darstellung des radioaktiv markierten Präparates verwendete Coenzym A wurde vor der Umsetzung gereinigt, damit die Bildung von Nebenprodukten, welche den Malonyltransferasetest stören, vermieden wird.

5,21 mg käufliches Coenzym A enthielt 4,25 mg (= 81,2 Gew.%)
= 5,5 μMol aktives Coenzym A, wie eine enzymatische Bestimmung mit Phosphotransacetylase (89) ergab. Die Prüfung auf SH-Gruppen (DTNB) zeigte, daß 7,35 μMol Thiole vorlagen, d.h. 75 Mol% der Thiole sind mit aktivem Coenzym A identisch. Das Handelsprodukt wurde auf eine kleine Fritte gegeben und in 1 ml Äthylmethylketon aufgeschlämmt. Nach intensiver Durchmischung mit dem Glasstab wurde das Lösungsmittel abgenutscht, jedoch nicht völlig bis zur Trockene. Nach achtmaliger Wiederholung dieses Vorganges wurde der Rückstand mit Wasser in ein Zentrifugenglas gespült. Die Bestimmung von aktivem Coenzym A ergab jetzt 5,05 μMol , die der Thiole 5,36 μMol , d.h. 94% der Thiole waren nun mit Coenzym A identisch.

Nach der Darstellung des 2-C-14-Malonyl-CoA wurde das im Überschuß eingesetzte S-(2-C-14)-Malonyl-N-Capryloylcysteamin durch Extraktion mit Bicarbonatlösung zurückgewonnen (60).

Um C-14-Malonsäure zu entfernen, wurde die Substratlösung mehrmals mit je 7ml wassergesättigtem Äthylmethylketon ausgeschüttelt

(pH = 2,0°C) bis keine Radioaktivität mehr extrahierbar war. Weiteres zweimaliges Ausschütteln mit peroxidfreiem Äther (je 7 ml) befreite die wässrige Phase von Ketonresten. Nach dem Verblasen der Ätherreste wurde mit etwas festem Kaliumhydrogencarbonat auf pH = 5 eingestellt. Die Ausbeute war quantitativ (bezogen auf Coenzym A). Ein Radiodünnschichtchromatogramm zeigte das Bild der Abb. 23. Aufbewahrt bei pH = 5 und bei -15°C waren die Präparate mindestens einige Wochen haltbar. Längere Aufbewahrung führte zur teilweisen Zersetzung, die offenbar durch allmähliche Hydrolyse der Thioesterbindung bedingt ist. Dies äußerte sich in einem wesentlich erhöhten Blindwert, wenn die Substanz im Testsystem der Malonyltransferase ohne Enzym eingesetzt wurde. Die erforderliche Nachreinigung führten wir mittels Ionenaustauscherchromatographie (65) durch. Auf diese Weise konnte ein Präparat, welches 28 Monate aufbewahrt worden war, von zwei Zersetzungsprodukten abgetrennt werden (Abb. 65). Eine Fraktion war nicht radioaktiv markiert und absorbierte bei 260 m μ (Coenzym A-Disulfid?), die andere Fraktion war radioaktiv, zeigte jedoch bei 260 m μ keine Absorption (C-14-Malonsäure?).

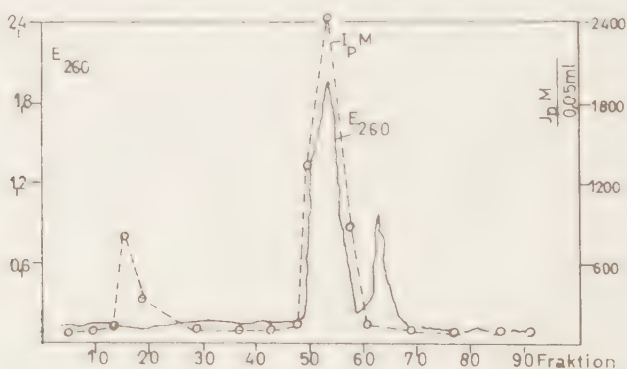


Abb. 65:

Ionenaustauscherchromatographie (65) von
2-C-14-Malonyl-Coenzym A (28 Monate gelagert)
an Whatman DE 52.

Acetyl- und Butyryl-CoA wurden durch Umsetzung der entsprechenden Säureanhydride mit CoA hergestellt (88).

Zur Darstellung von 1-C-14-Acetyl-CoA wurde analog der Vorschrift zur Herstellung von 1-C-14-Acetyl-N-Acetylcysteamin (36) verfahren. (1-C-14-Acetanhydrid mit überschüssigem Coenzym A versetzen, Nachacetylierung des Coenzym A durch unmarkiertes Acetanhydrid). Das Präparat wurde anschließend von der entstandenen radioaktiven Essigsäure befreit, indem die wässrige Lösung mit 3N Schwefelsäure auf pH = 2 gebracht wurde (0°C) und anschließend bei 0°C drei Stunden mit peroxidfreiem Äther perforiert wurde. In den Vorratsbehälter der Perforationsapparatur, welcher den Äther enthielt, wurden zusätzlich 0,2 ml 0,3N KOH gegeben, um die extrahierte Essigsäure zu binden. Nach dem Verblasen der Ätherreste wurde die wässrige Lösung mit wenig festem KHCO_3 auf pH = 4 gebracht.

Das Radiogramm einer Dünnschichtchromatographie (System: Cellulose - n-Butanol/Eisessig/Wasser (4/1/5) (v/v), Oberphase) ergab, daß das Präparat einheitlich war ($R_f = 0,1$). Auch durch Ionenaustauscherchromatografie nach (65) an Whatman DE-52 konnte weder eine radioaktive noch eine bei 260 m μ absorbierende Verunreinigung abgetrennt werden.

c) Pantetheinderivate

Benzoylpantethein wurde von Herrn Dr. Pirson und Herrn Winnewisser zur Verfügung gestellt und ist nach (59) dargestellt worden. Pantethein wird durch Verseifung von Benzoylpantethein dargestellt (21, 57). Die folgenden Reaktionsbedingungen ergeben ein reines Präparat: 15 mg Benzoylpantethein wurden in 0,2 ml destilliertem Methanol gelöst. Nach Zugabe von 3 ml Wasser und 0,3 ml 4N KOH wurde die Lösung drei Minuten lang mit Stickstoff durchgespült. Sodann erfolgte, nach Ansäuern auf pH = 4 (3N HCl), eine dreimalige Extraktion mit peroxidfreiem Äther, um die Benzoessäure zu entfernen. Nach dem Verblasen des Äthers wurde die Lösung unter Stickstoff aufbewahrt, jedoch nicht länger als einige Stunden benützt. Ausbeute: 97 - 100%.

Die Papierchromatographie (System: Whatman 1 - n-Butanol/
Eisessig/Wasser (4/1/5) (v/v), Oberphase (59) zeigte,
daß aus der einheitlichen Ausgangsverbindung ($R_f = 0,95$) reines
Pantethein ($R_f = 0,75$) entstanden war.

Unterwirft man Benzoylpantethein den in (21,57) angegebenen
Hydrolysebedingungen, dann wird Pantethein offenbar weiter abge-
baut, denn es treten zusätzlich Thiole bei R_f ca. 0,47 (21) bzw.
0,38 (57) auf.

Die Darstellung von Acetylpantethein wurde analog der Acetyl-CoA-
Darstellung durchgeführt und S-(1-C-14)-Acetylpantethein wurde wie
1-C-14-Acetyl-CoA hergestellt.

Zur Synthese von S-Malonylpantethein und S-(2-C-14)-Malonylpantethein
wurde analog der Vorschrift (60) verfahren. Bei der Darstellung
des radioaktiven Substratmodells wurde die zweite Ätherperforation
jedoch auf sechs Stunden ausgedehnt.

Ausbeute 95% - 100% (bezogen auf Pantethein).

Die Prüfung des Präparates auf Reinheit erfolgte in den Dünnschicht-
chromatogrammen der Abb. 66.

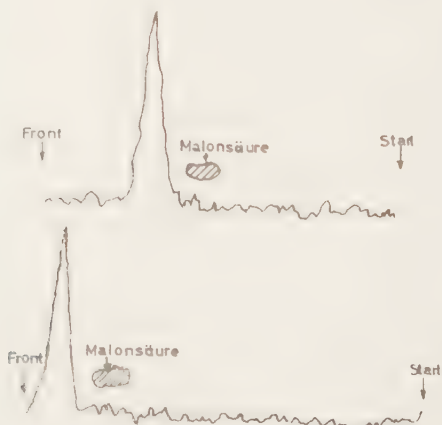


Abb. 66: Radiodünnschicht-
chromatogramme
von 2-C-14-
Malonylpantethein.

Systeme:

Cellulose-n-Butanol/Wasser/Eisessig (4:5:1) (oberes
Bild)

Cellulose - 0,1 M Acetatpuffer pH = 4,5/96%iges
Äthanol (1:1) (unteres Bild).

d) N-Acetylcysteamin Derivate

S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin wurde nach (24) dargestellt.

S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin (43) erhielten wir von Herrn Dr. Vogel. (D,L)-3-Hydroxybutyryl-S-(N-Acetylcysteamin) (90) wurde von Herrn Dr. Arnstadt zur Verfügung gestellt.

(D)-(-)-3-Hydroxybutyryl-S-(N-Acetylcysteamin) wurde aus S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin enzymatisch mit Fettsäuresynthetase dargestellt:

20 ml 0,2 M KPO_4 -Puffer pH = 7,5, welcher $1,12 \cdot 10^{-2}$ M S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin war, wurde mit 16 mg FSS versetzt und 17 Stunden sich selbst überlassen (Zimmertemperatur). Nachdem die Lösung durch Lyophilisation bis 10 ml Restvolumen eingeeengt worden war, wurde zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der abdecantierte Überstand mit Ammoniumsulfat gesättigt. Die wässrige Lösung wurde sodann zuerst mit 85 ml, dann mit 50 ml Essigester ausgeschüttelt. Nachdem die vereinigten und filtrierten organischen Extrakte am Rotationsverdampfer bis zur Trockene einrotiert worden waren, hinterblieb ein hochviskoses Öl. Dieser Rückstand wurde in 5 ml Aceton aufgenommen und der präparativen Dünnschichtchromatographie unterworfen. (System: Kieselgel/Ätanol (96%) Chloroform/Essigester = 2/30/10 (v/v)) 3-Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin wandert entsprechend $R_f = 0,28$ und S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin entsprechend 0,53, wie durch Vergleich mit den authentischen Substanzen festgestellt wurde.

4. Allgemeine analytische Methoden

a) Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die Biuretmethode nach BEISENHIERZ et al (92) verwendet. Der Biuretfaktor beträgt 8,6 (24). Bei verdünnten und reinen Proteinlösungen wurde nach WARBURG und CHRISTIAN verfahren (93). Proteinfraktionierungen wurden qualitativ an Hand der Absorption bei 280 m μ verfolgt.

b) Gehaltsbestimmung von Substraten und Präparaten.

Thioester wurden mit der verzögerten Nitroprussidreaktion nach LYNNEN (94), im Hydroxamsäuretest nach STADTMAN (98) oder durch Messung der Thioesterabsorption bei 233 m μ ($= 4600 \text{ cm}^2/\text{mMol}$ (100)) gegen eine Vergleichsküvette, in der die gleiche Menge Thioester verseift worden war, bestimmt. Thiole wurden mit Ellman's Reagens (DTNB), bestimmt. Den Messungen lag ein Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{405 \text{ m}\mu} = 13300 \text{ cm}^2/\text{mMol}$ (99) zugrunde. S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin wurde an Hand seiner charakteristischen Absorption bei 263 m μ (43) bestimmt. Malonyl-CoA-Bestimmungen erfolgten im optischen Test der Fettsäuresynthetase. Ebenso konnten Malonylpantethein und S-Malonyl-N-Capryloylcysteamin bestimmt werden, soweit dazu nicht die unter "Thioesterbestimmung" aufgeführten Methoden herangezogen wurden (9). Coenzym A wurde enzymatisch mit Phosphotransacetylase bestimmt (66). Der Gehalt von Acetyl-CoA-Lösungen wurde mit Malatdehydrogenase und Citratsynthase nach BUCKEL und EGGERER (68) festgestellt.

c) Radioaktivität

Die C-14-Bestimmungen wurden im Szintillationszähler oder -bei Dünnschicht- und Papierchromatogrammen- im Methandurchflußzähler durchgeführt.

Dioxan-Szintillationslösung:

1 Liter destilliertes und über basisches Aluminiumoxid filtriertes Dioxan enthielt 100g Naphtalin, 10g PPO und 250 mg Dimethyl-POPOP.

Toluolszintillationslösung:

1 Liter destilliertes und über basisches Aluminiumoxid filtriertes Toluol enthielt 4g PPO und 200mg Dimethyl-POPOP.

Wässrige Lösungen wurden auf Whatman I Papier (3.1,7 cm) aufgetragen, eingetrocknet und unter Toluollösung ausgezählt oder direkt in der Dioxan-Szintillationslösung bestimmt.

d) Papier- und Dünnschichtchromatogramme.
Qualitativer Nachweis der getrennten Substanzen.

Alle Papier- und Dünnschichtchromatographien wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Es wurde mit aufsteigender mobiler Phase gearbeitet.

Der qualitative Nachweis von Thiolen und Thioestern erfolgte mit Nitroprussidreagens (32), wobei im einzelnen verfahren wurde, wie in (67) angegeben. Thioester konnten auch mit der Hydroxamsäuremethode (98) sichtbar gemacht werden, indem das Chromatogramm zunächst mit neutraler Hydroxylaminlösung besprüht wurde und nach fünf Minuten mit FeCl_3 -Reagens behandelt wurde.

Andere organische Substanzen wurden durch Besprühen mit Kaliumpermanganatlösung oder Jod/Methylenchlorid sichtbar gemacht.

e) Disk- und SDS-Gelelektrophorese

Alle Gelelektrophoresen wurden in Glasröhrchen ausgeführt, die die Größe 15,0,8 cm (innerer Durchmesser) hatten und die 11 cm hoch mit Trenngellösung aufgefüllt worden waren.

Diskelektrophoresen wurden nach den Angaben von MAURER (42) durchgeführt. Die apparative Ausrüstung ist in (36,78,38) eingehend beschrieben.

Zur Verwendung kamen das System Nr. 1 (42) (System "A") und das modifizierte System Nr. 1 (63, bzw. 42 S. 40) (System "B"). Die Gele waren 4%ig (0,4 g N,N'-Methylenbisacrylamid/100 ml Lösung) an Acrylamid. Auf die Verwendung eines Sammelgels wurde verzichtet. Die zur Trennung aufgesetzten Probelösungen enthielten zwischen 50 und 300 μ g Protein in maximal 0,1 ml. Die Diskelektrophoresen wurden im Kühlraum (4°C) durchgeführt. Die maximale Stromstärke betrug 5 mA pro Röhrchen.

SDS-Gelelektrophoresen wurden nach WILDER und OSBORN (64) in der Modifikation von SCHWEIZER et al durchgeführt (76).

Die Färbung der Gele erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau.
(1,25 g Farbstoff in 454 ml 50% Methanol und 46 ml Essigsäure (78).
Färbedauer: Mindestens zwei Stunden.
Die Entfärbung erfolgte in einer Mischung aus 75 ml Eisessig,
50 ml Methanol und 875 ml dest. Wasser (78).

5. Isolierung und Aktivitätsbestimmung der Fettsäuresynthetase.

Die Anreicherung der FSS aus Bäcker- oder Bierhefe erfolgte bei 4°C. Zum Zellaufschluß wurde abgepresste Hefe im Gewichtsverhältnis 1 : 1 mit 0,2 M KPO_4 pH = 7,5 verrührt und nach (72) in einem Manton-Gaulin-Homogenisator bei 500 - 560 atm zweimal aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde nach LYNEN (30) und OESTERHELT (24) zu Fettsäuresynthetase verarbeitet.

Eine weitere Möglichkeit, Fettsäuresynthetase anzureichern, bestand in der Durchführung der im folgenden aufgeführten Schritte.
4 kg Hefe werden in 4 l Wasser, welches 200 ml einer Lösung von 6 mg PMSF/ml 96%iges Äthanol enthält, aufgeschlämmt und wie bereits beschrieben, aufgeschlossen. Der nach 45minütiger Zentrifugation bei 3000 g erhaltene Überstand (Leitfähigkeit 12 Millisiemens) wird mit Calciumphosphatgel nach Kunitz (87) im Gewichtsverhältnis 1 : 1 versetzt und nach dem Einstellen des pH auf 6,8 (0,2 N Essigsäure bzw. Ammoniak) 15 min mit einem Flügelrührer gerührt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min 3000 g) wird der Überstand mit einem Zehntel seines Volumens 1 M KPO_4 pH = 6,5 und Ammoniumsulfat bis zur 50%igen Sättigung versetzt. Nachdem 15 min nachgerührt worden ist, wird eine Stunde bei 15000 g zentrifugiert. Der Rückstand wird mit Puffer ^{*)} in mindestens dem vierfachen seines Volumens gelöst. Der nach 15stündiger Zentrifugation bei 50000 g

^{*)} Puffer: 0,1 M KPO_4 , pH = 6,5, $2 \cdot 10^{-3}$ M EDTA, 10^{-3} M Thioglykol. Unmittelbar vor Gebrauch wurde diese Lösung mit einer Lösung von 6 mg PMSF/ml 96%iges Äthanol im Volumenverhältnis 20 : 1 versetzt.

(Rotor 21, Beckman) erhaltene Niederschlag wird, nachdem er in 1300 ml Puffer gelöst worden ist, mit Ammoniumsulfat bis zur 30%igen Sättigung versetzt und 45 min bei 50000g (Rotor 19, Beckman) zentrifugiert. Der Rückstand wird wiederum in 1300 ml aufgenommen und die Lösung 140 min bei 50000 g (Rotor 19, Beckman) zentrifugiert. Der hellgelbe klare Überstand *) wird wieder 15 Stunden bei 50000 g (Rotor 21, Beckman) zentrifugiert, der Niederschlag in 200 ml Puffer aufgenommen, durch 30minütiges Zentrifugieren bei 100000 g (Rotor 30, Beckman) von unlöslichem Material befreit und die Fettsäuresynthetase durch dreistündiges Zentrifugieren bei 360000 g (Rotor 60 Ti, Beckman) oder 6 - 7stündiger Zentrifugation bei 100000 g (Rotor 30, Beckman) sedimentiert. Den Anreicherungsverfahren gibt Tab. 7 wieder.

Stufe	Protein g	Gesamtaktivität E	spez. Akt. mE/Mg	Ausbeute %
Rohextrakt				
A.S.I.-Nd.	54	2920	54	100
Spinco 2 Nd.	5,9	1960	330	66
Letzter Spinco-Nd.	1,1	1870	1700	64

Tab. 7: Typisches Anreicherungsverfahren der FSS-Isolierung. Die Fettsäuresynthetaseaktivität in den Rohextrakten verschiedener Hefechargen schwankte zwischen 300 und 1500 E/kg Trockengewicht. Rohextrakte mit hoher Aktivität konnten in Ansätzen aus Bierhefe erhalten werden.

Die spezifische Aktivität der Präparate betrug 1500 - 2500 mE/mg.

Wenn die so isolierte FSS sich in der analytischen Diskoelektrophorese (s.S.49 u.77) noch nicht einheitlich verhielt, wurde eine weitere Reinigung nach (36) in einem 10 - 30%igen Rohrzuckergradienten (10^{-3} M Dithiothreitol) bei 26000 UpM (Laufzeit 15 Stunden, $T = 0^{\circ}\text{C}$) oder nach (91) durch Chromatographie an Hydroxylapatit (stufenweise Elution mit KPO_4 pH = 6,5 steigender Molarität, welcher zusätzlich 10^{-3} M an Thioglykol war, FSS wird mit 0,2 M KPO_4 eluiert.)

*) Gelegentlich wird ein Teil der Aktivität im Niederschlag gefunden. In diesem Fall ist der Schritt zu wiederholen.

durchgeführt. Aufbewahrt wurde die Fettsäuresynthetase in 0,1 M KPO_4 pH = 6,5 (zusätzlich 10^{-3} M Dithiothreitol), welcher mit 90% Ammoniumsulfat gesättigt war, bei -15°C . Vor Gebrauch wurden die niedermolekularen Bestandteile durch eine Gelfiltration (Sephadex G25), durch Ultrazentrifugation oder durch Dialyse abgetrennt (36).

Anreicherung mit Polyäthylenglykol

Eine sehr effektive Anreicherung kann mit Polyäthylenglykol 6000 erzielt werden. Der Rohextrakt konnte durch zwei Fällungsschritte etwa 17fach angereichert werde (Tab. 8).

Stufe	Protein g	Gesamtaktivität E	spez. Akt. mE/mg	Ausbeute
Rohextrakt	140	1480	10,6	100
1. Fällung (Üst.)	60	1440	24	97
2. Fällung (Nd.)	7,7	1420	185	96

Tab. 8: Anreicherung mit Polyäthylenglykol 6000 (72).

2 kg abgepresste Hefe wurden in 2 l "Puffer" (s. S. 80, Fußnote) aufgeschlämmt und aufgeschlossen, wie auf S.80 beschrieben. Der zellfreie Rohextrakt, den wir nach 45minütiger Zentrifugation bei 3000 g erhielten, wurde mit einer wässrigen Polyäthylenglykol-lösung (Gewichtsverhältnis 1 : 1) versetzt (100 Teile Proteinlösung und 7,7 Teile Polyäthylenglykollösung), 15 min gerührt und dann eine Stunde bei 15000 g zentrifugiert. Die Aktivität befand sich jetzt im Überstand und nach der zweiten Fällung (100 Teile Proteinlösung und 5,5 Teile Polyäthylenglykol, 15 min Rühren, eine Stunde Zentrifugation bei 15000 g) im Niederschlag.

Die weitere Anreicherung der Fettsäuresynthetase durch Kombination dieser Schritte mit Elementen der beschriebenen Anreicherungsfolge erscheint sinnvoll, wurde jedoch nicht ausgeführt.

Bestimmung der Aktivität der Gesamtsynthese

Eine Küvette ($d = 1 \text{ cm}$) enthielt im Volumen $1,0 \text{ ml}$ (25°C):
 $100 \mu\text{Mol KPO}_4$, $\text{pH} = 6,5$, $10 \mu\text{Mol Cystein}$, $0,2 \text{ mg Serumalbumin}$,
 $0,07 \mu\text{Mol Acetyl-CoA}$, $0,2 \mu\text{Mol TPNH}$ und ca. $5 \times$ Enzym. Nach
Aufnahme des Blindlaufes (zwei bis drei Minuten) wurde die
Fettsäuresynthese durch Zugabe von $0,1 \mu\text{Mol Malonyl-CoA}$ gestartet
und bei $334 \text{ m}\mu$ verfolgt. Eine Millieinheit ist die Enzymmenge, die
unter den Testbedingungen 2 nMol TPNH (entsprechend $1 \text{ nMol Malonyl-CoA}$)
pro Minute umsetzt.

6. Zu Abschnitt B. Beschreibung der Modellreaktionen

Alle Modellreaktionen werden bei 25°C ausgeführt.

Schichttiefe der Küvetten bei den optischen Bestimmungen 1 cm .

Abweichende Substrat- und Enzymkonzentrationen sind den einzelnen
Abbildungen zu entnehmen.

a) 3-Ketoacylreduktase (8,25)

1 ml enthält: $100 \mu\text{Mol KPO}_4$, $\text{pH} = 6,5$, $0,2 \text{ mg SA}$, $0,2 \mu\text{Mol TPNH}$ und 1 bis $5 \times$ FSS. Nach zwei bis drei Minuten langer
Beobachtung des Blindlaufes wird die Reaktion mit $15 \mu\text{Mol S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin}$ gestartet ($334 \text{ m}\mu$).

1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die in einer Minute 1 nMol TPNH umsetzt.

b) 3-Hydroxyacyldehydrogenase

1 ml enthält: $100 \mu\text{Mol KPO}_4$, $\text{pH} = 7,5$, $5,3 \cdot 10^{-3} \text{ M D-(-)-3-Hydroxy-S-(N-Acetylcysteamin)}$ und $7,1 \cdot 10^{-3} \text{ M TPN}^+$. Nach
Aufnahme des Blindlaufes wird die Reaktion mit 20 bis $100 \times$ FSS
gestartet ($334 \text{ m}\mu$).

c) 2,3-Enoylreduktase (8,25)

Die Messungen werden in einem Doppelstrahlphotometer durchge-
führt ($334 \text{ m}\mu$).

2 ml enthalten: $500 \mu\text{Mol KPO}_4$, $\text{pH} = 6,5$, $0,6 \mu\text{Mol TPNH}$ und
 $0,1$ bis 1 mg FSS . Nach drei bis vierminütiger Aufnahme des
Blindlaufes gegen eine Referenzküvette, die die gleichen Zu-
sätze enthält, wird die Reaktion durch Zugabe von $30 \mu\text{Mol S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin}$ in die Messküvette gestartet.

1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die in 1 min 1 nMol TPNH umsetzt.

d) Transhydrogenase

1 ml enthält: 0,4 μ Mol DPNH, 0,4 μ Mol TPN⁺, 100 μ Mol KPO₄, pH = 7,5, 225 mE FSS, nach fünf Minuten Inkubation wurde durch fünfminütiges Erhitzen (Wasserbad, 100°C) abgestoppt.

Nach Zugabe von 0,27 E Alkoholdehydrogenase und 0,05 ml Äthanol (96%) war keine Zunahme der Extinktion bei 334 m μ festzustellen.

..) Triacetsäurelactonbildung

2 ml enthalten: 200 μ Mol KPO₄, pH = 6,5, 40 nMol Cystein, 290 nMol Acetylpanthetin und 0,5 bis 2 mg FSS. Nach Aufnahme des Blindlaufes (zwei Minuten) gegen eine Küvette, die die gleichen Zusätze enthält (bei Verwendung eines Spektralphotometers mit Nullpunktsunterdrückung kann auch gegen Wasser gemessen werden), wird die Reaktion durch Zugabe von 560 nMol Malonylpantethetin in die Meßküvette gestartet und bei 278 m μ verfolgt.

||) Kondensation (8, in der Modifikation nach 36)

0,3 ml enthalten: 50 μ Mol Tris/HCl pH = 7,5, 2,5 μ Mol C-14-NaHCO₃ (10⁷ IpM), 0,15 μ Mol CoA (mit 0,05 N NaOH neutralisiert), 30 μ Mol S-Acetoacetyl-N-Acetylcysteamin, 5 μ Mol Cystein, 5 μ Mol EDTA. Start der Reaktion nach 3 min Vorinkubation mit 620 μ FSS. Stopp der Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml Eisessig nach 2 bis 10 min. 0,4 ml werden auf Whatman I-Papier aufgetragen und eingetrocknet (Infrarotlampe, Abzug!). Die am Papier haftende säurestabile Radioaktivität wird gemessen. Die Enzymmenge, die pro Minute 1 nMol CO₂ inkorporiert, entspricht einer Millieinheit.

g) 3-Hydroxyacyldehydratase (8,25)

Die Messungen werden mit vier Küvetten in einem Doppelstrahlphotometer bei 263 m μ durchgeführt.

Alle Küvetten enthalten in 2 ml Gesamtvolumen 800 μ Mol Tris/HCl pH = 7,5, 1 μ Mol EDTA, Küvette 1 und 3 enthalten 30 μ Mol D,L-S-3-Hydroxybutyryl-N-Acetylcysteamin.

Die Küvetten 1 und 2 werden in den Meßstrahl und die Küvetten 3 und 4 in den Vergleichsstrahl des Spektralphotometers gestellt. Der Start der Reaktion erfolgt dann durch Zugabe von 0,5 bis 2 mg Fettsäuresynthetase in die Küvetten 1 und 4.

1 Millieinheit ist die Enzymmenge, die pro Minute 1 nMol Modellsubstrat umsetzt. Der Extinktionskoeffizient des Substrates beträgt $6,5 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ (43).

Die Substratabhängigkeit (Abb. 17) wurde mit jeweils 1,02 mg FSS durchgeführt. Das Enzym war in KPO_4 aufbewahrt, die Küvetten 1 und 4 enthielten also zusätzlich 5 $\mu\text{Mol KPO}_4$, $\text{pH} = 6,5$.

h) 2,3-Enoylhydratase

2 ml enthalten: 200 $\mu\text{Mol Tris/HCl}$, $\text{pH} = 7,5$, S-Crotonyl-N-Acetylcysteamin entsprechend Abb. 18. Die Reaktion wurde mit 840 μg FSS gestartet und die Extinktionsabnahme bei 263 $\text{m}\mu$ (Spektralphotometer mit Nullpunktsunterdrückung) verfolgt. Als eine Millieinheit ist diejenige Enzymmenge definiert, die unter den Bedingungen des Testansatzes in einer Minute den Umsatz von 1 nMol Modellsubstrat bewirkt.

i) Malonyltransferase (in Anlehnung an 21,25) (Vergl. auch S. 29 Fußnote)

Ein gut verschließbares Zentrifugenglas enthält in 0,75 ml: 50 $\mu\text{Mol KPO}_4$, $\text{pH} = 6,5$, 0,1 mg SA, 0,06 $\mu\text{Mol 2-C-14-Malonyl-CoA}$, 0,6 $\mu\text{Mol Pantethein}$.

Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe von Enzymprotein (0,3 - 6 μg). Nach 5 min Inkubation wird mit 0,05 ml 3 N H_2SO_4 abgestoppt.

Nachdem im Reaktionsansatz 450 mg Ammoniumsulfat gelöst worden sind, wird das gebildete 2-C-14-Malonylpantethein mit 5 ml wassergesättigtem Methyläthylketon extrahiert. 4,25 ml der Oberphase werden mit 0,8 ml 1%iger wässriger Kaliumhydrogencarbonatlösung ausgeschüttelt und diese mit dreimal 5 ml Dioxan-Szintillationslösung in ein Zählgläschen gespült und die Radioaktivität bestimmt.

Beim Referenzansatz, also einem Testansatz ohne Enzym, wurden 1 - 2% der eingesetzten Radioaktivität als Blindwert erhalten. Dieser wurde von den Meßwerten abgezogen.

Unter den Testbedingungen werden 74% (optische Bestimmung, Abb. 67) bzw. 79% (Bestimmung mit 2-C-14-Malonylpantethein, Abb. 68) des jeweils vorhandenen 2-C-14-Malonylpantethein erfaßt.

Die Bestimmung mit 2-C-14-Malonylpantethein ist genauer, deshalb werden die in der Testreaktion erhaltenen Meßwerte von 79% auf 100% berichtigt.

Als eine Millieinheit ist diejenige Enzymmenge definiert, die in einer Minute den Umsatz von 1 nMol Malonyl-CoA bewirkt.

Abb. 67:

0,75 ml Wasser enthielt: 50 μ Mol KPO_4 , pH = 6,5, 0,1 mg Serumalbumin und verschiedene Mengen Malonylpantethein. Die Aufarbeitung erfolgte, wie bei der Beschreibung des Malonyltransferasetests angegeben. Die Ketonextrakte wurden jedoch einrotiert, der Rückstand in Wasser gelöst und mit Aliquoten der Malonylpantetheingehalt im FSS-Test bestimmt. 100% = 0,25 μ Mol Malonylpantethein.

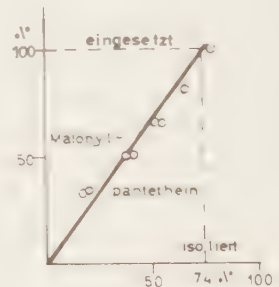
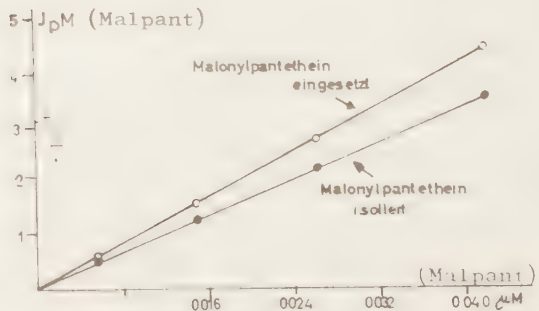


Abb. 68:

0,75 ml Wasser enthielt: 50 μ Mol KPO_4 , pH = 6,5, 0,1 mg Serumalbumin und verschiedene Mengen 2-C-14-Malonylpantethein ($1,3 \cdot 10^5$ IpM/Mol). Aufarbeitung wie unter "Malonyltransferasetest" beschrieben.



j) Acetyltransferase (in Anlehnung an 21,25)

Ein gut verschließbares Zentrifugenglas enthält in 0,7 ml (25°C) : 50 μMol KPO_4 , pH = 6,5, 0,2 mg Serumbumin und 1-C-14-Acetyl-CoA, Pantethein und FSS wie in den Legenden der Abbildungen angegeben. Start der Reaktion mit 1-C-14-Acetyl-CoA, Stopp mit 0,05 ml 3 N H_2SO_4 .

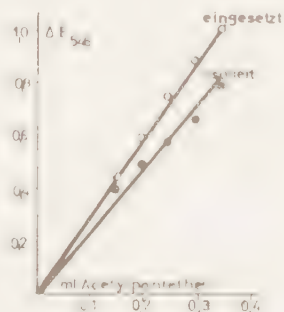
Nachdem im Reaktionsansatz 450 mg Ammoniumsulfat gelöst worden sind, wird das gebildete 1-C-14-Acetylpantethein mit 5 ml wasser-gesättigtem Methyläthylketon extrahiert. 4,25 ml der Oberphase werden mit 1 ml Wasser und 5 ml Petroläther versetzt und das 1-C-14-Acetylpantethein in die wässrige Phase geschüttelt. Diese wurde mit dreimal 5 ml Dioxan-Szintillationslösung in ein Zählgläschen gespült und die Radioaktivität bestimmt. Im Referenzansatz ohne Enzym wurden etwa 1% der eingesetzten Radioaktivität als Blindwert erhalten. Dieser wurde von den Meßwerten abgezogen.

Unter den Testbedingungen werden 79% des jeweils vorhandenen 1-C-14-Acetylpantethein erfaßt (Abb. 69).

Die in der Testreaktion erhaltenen Werte wurden von 79% auf 100% umgerechnet.

Abb. 69:

0,7 ml Wasser enthielten 50 μMol KPO_4 , pH = 6,5, 0,2 mg SA, verschiedene Mengen Acetylpantethein. Aufarbeitung wie bei "Acetyltransferase" beschrieben. Die erhaltene wässrige Phase wurde lyophilisiert (Ketone stören den Test), der Rückstand in 0,7 ml Wasser aufgenommen und mit Aliquoten der Thio-estergehalt mittels der verzögerten Nitroprussidreaktion bestimmt (94). Das Maximum der Farbentwicklung wurde nach zwei Minuten erreicht.



k) Acetyltransferase, optische Bestimmungsmethode mit

dem gekoppelten Enzymsystem der Gl. 12 a, b, c.

1 ml enthält: 200 μMol Tris/HCL, pH = 8,1, 10 μMol R,S-Malat, 3 μMol DPN⁺, 0,625 μMol Acetylpanthetin, 11 E Malat-dehydrogenase, nach der Einstellung des Gleichgewichts der Hilfsreaktion (68) werden 4,4 E Citratsynthase und 0,32 μMol Coenzym A zugegeben und entsprechend Abb. 34 mit FSS gestartet.

1) Hemmung der FSS mit N-Äthylmaleinimid (25)

Eine Enzymlösung (ca. 0,5 mg/ml, 0,1 M KPO₄, pH = 6,5, frei von niedermolekularen Bestandteilen, 0°C) enthält NAM in einer Konzentration von 10⁻²M. Nach gewissen Inkubationszeiten wird mit Cystein (1,5facher Überschuß) abgestoppt. Nach weiteren fünf Minuten werden die enzymatischen Aktivitäten bestimmt.

7. Zu Abschnitt C.

a) Spaltung und Rekonstitution der FSS (36,81) (Abb. 51, 54-60)

Eine FSS-Lösung (5-10 mg/ml, 0,1 M Tris/HCL, pH = 7,5, 13 mM an DTT) war 1 M an LiCl. Der Ansatz wurde geteilt und der eine Teil fünffach mit 0,1 M KPO₄, pH = 7,5 (13 mM DTT) verdünnt und die enzymatischen Aktivitäten bestimmt. Der andere Teil wurde in einem Trockeneis/Aceton-Kältebad eingefroren. Nach 15 min wurde bei Raumtemperatur aufgetaut. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt und dann die enzymatischen Aktivitäten geprüft. Bei der Bestimmung der Enoylreduktase wurde auf den Blindlauf verzichtet, um eine etwaige Reaktivierung dieser Teilaktivität in der Küvette zu vermeiden.

Zur Reaktivierung wurde fünffach mit 0,1 M KPO₄, pH = 7,5 (13 mM DTT) verdünnt und mit Aliquoten die Aktivitäten gemessen. Die Reaktivierung erfolgte bei 20°C.

b) Reaktionsordnung (Abb. 61 und 62).

LiCl-gespaltenes Enzym (6,2 mg/ml) wurde mit 0,1 M KPO₄, pH = 7,5, auf das vier- bis 100fache verdünnt (25°C) und

nach 2 bis 14 Minuten Aliquote (0,1 bis 0,2 ml) entnommen und damit die Aktivitätsbestimmung der 3-Ketoacylreduktase gestartet. Diese Bestimmungen erfolgten in 0,2 M Tris/HCl, pH = 7,5, um die weitere Reaktivierung in der Küvette weitgehend zu unterbinden (vgl. Abb. 52).

Die Reaktivierung der Gesamtaktivität wurde analog vermessen, der Reaktivierungspuffer war jedoch 20 mM an DTT und 10^{-6} M an FMN. Die Aktivitätsbestimmungen erfolgten ebenfalls in 0,2 M Tris/HCl, indem nach dem Blindlauf (hier 30 Sekunden) mit Malonyl-CoA gestartet wurde.

- c) Präparative Diskelektrophorese, Trennung der Spaltprodukte.
- Es wurde sinngemäß entsprechend der Gebrauchsanleitung für die Elektrofokussierausrüstung LKB 8101 verfahren (51). Die Präparative Diskelektrophorese erfolgte im System "B" (s.S. 78). Auf die Kathodenlösung (12 g Rohrzucker, 2,2 ml Elektrodenpuffer (unverdünnt), Wasser ad 22 ml) wurden 80 ml eines 10 - 25%igen Rohrzuckergradienten aufgebaut, der 2,4 ml 1 N HCl und 0,503 g Tris enthielt und 10^{-3} M an Dithiothreitol war. Die Polymerisation des Acrylamidgels (Schichtdicke ca. 5mm) erfolgte auf dem Gradienten. Nach dem Überschichten des polymerisierten Gels mit Elektrodenpuffer wurde LiCl-gespaltene Synthetase (5,2 mg) der präparativen Diskelektrophorese unterworfen. T = 2°C, Stromstärke 4 mA. Der Lauf der Proteine kann mit der UV-Lampe verfolgt werden.

E. Zusammenfassung

1. Mit Hilfe von Substratmodellen wurden die Teilaktivitäten (8) der Fettsäuresynthetase untersucht.

Es wurden Messungen zur Affinität der beiden Reduktasen für verschiedene, in der Mercaptankomponente abgeänderte Modellverbindungen durchgeführt. Die Wechselzahl der 2,3-Enoylreduktase nimmt beträchtlich zu, wenn der Crotonylrest der Modellverbindung durch Octenoyl ersetzt wird. Der Pyridinnukleotidbedarf der Fettsäuresynthese wurde untersucht. Die Rückreaktionen der reversiblen Modellreaktionen konnten nachgewiesen werden. In der Teilreaktion der Palmitylübertragung konnte Coenzym A durch die Akzeptormodelle Pantethein, N-Acetylcysteamin und Cysteamin ersetzt werden. Die radioaktiven Bestimmungsmethoden des Malonyl- und Acetyltransfers wurden neu standardisiert. Der Nachweis des Malonyltransfers und die Aktivitätsbestimmung der Acetyltransferase konnten auch durch optische Verfahren erfolgen. Die Aktivität der Malonyl- und Acetyltransferase wird nicht verändert, wenn die Gesamtreaktion mit N-Äthylmaleinimid gehemmt wird. Dies stimmt überein mit den Befunden anderer Autoren, wonach das aktive Zentrum dieser Teilenzyme keine durch N-Äthylmaleinimid hemmbaren Gruppen enthält.

2. Es wurden die Teilaktivitäten des mit Lithiumchlorid (36,81) in Untereinheiten gespaltenen Multienzymkomplexes untersucht. Die Aktivitäten der Acetyl- und Malonyltransferase sowie der 3-Hydroxyacyldehydratase bleiben im gespaltenen System völlig oder weitgehend aktiv. Flavinmononucleotid, die prosthetische Gruppe der 2,3-Enoylreduktase, dissoziiert unter den Spaltbedingungen weitgehend ab. Die Enzymuntereinheiten katalysieren deshalb die 2,3-Enoylreduktion nicht, die Aktivität bildet sich jedoch rasch zurück, wenn das gespaltene System den Reaktivierungsbedingungen unterworfen wird. Die Fettsäuresyntheseaktivität und die Aktivität der 3-Ketoacylreduktase und des kondensierenden Enzymes sind im gespaltenen System ebenfalls verschwunden, kehren jedoch zurück, wenn der

Multienzymkomplex rekonstituiert wird. Unter geeigneten Bedingungen können mehr als 70% der ursprünglich vorhandenen Fettsäuresyntheseaktivität zurückgewonnen werden. Die Reaktionsordnung der Reaktivierung beträgt $n = 1,4$ für die Aktivität der Fettsäuresynthese und $n = 1$ für die der 3-Ketoacylreduktase. Ein Versuch, die Untereinheiten mittels Diskelektrophorese präparativ voneinander zu trennen, wird beschrieben.

F. Literaturverzeichnis

1. F. Knoop, Beitr. chem. Physiol. Pathol. 6 (1904) 150
2. F. Lynen, S. Ochoa, Biochim. Biophys. Acta 12 (1953) 299
3. R. Sonderhoff, H. Thomas, Ann. Chem. 530 (1937) 195
4. D. Rittenberg, K. Bloch, J. Biol. Chem. 160 (1945) 417
5. F. Lynen, J. cell. comp. Physiol. 54, Suppl. 1, (1959) 33
6. R. O. Brady, Proc. Nat. Acad. Sci. 44, (1958) 993
7. S. J. Wakil, J. Amer. Chem. Soc. 80 (1958) 6465
8. F. Lynen, Fed. Proc. 20 (1961) 941
9. F. Lynen, I. Hopper-Kessel, H. Eggerer, Bioch. Z. 340 (1964) 95
10. F. Lynen, Bioch. J. 102 (1967) 381
11. F. Lynen, in Miami Winter Symposia 1, S. 151, North. Holland Publ. Comp. Amsterdam 1970
12. F. Lynen, in Current Trends in the Biochemistry of Lipids, S. 5, Acad. Press, London und N.Y. 1972
13. J. J. Volpe, P. R. Vagelos, Ann. Rev. Bioch. (1973) 21
14. W. Pirson, Diss. Univ. München, 1970
15. W. Pirson, F. Lynen, Hoppe-Seyler's Z. Ph. Ch. 352 (1971) 797
16. F. Lynen, D. Oesterhelt, E. Schweizer, K. Willecke, Cellular Compartmentalization and Control of Fatty Acid Metabolism, Universitetsforlaget, Oslo 1968, 1-24
17. E. Schweizer, F. Piccinini, C. Duba, S. Günther, E. Ritter. F. Lynen, Eur. J. Bioch. 15 (1970) 483
18. I. Pilz, M. Herbst, O. Kratky, D. Oesterhelt, F. Lynen, Eur. J. Biochem. 13 (1970) 55
19. W. Winnewisser, Diss. Univ. München 1974, im Druck
20. E. Schweizer, K. Willecke, W. Winnewisser, F. Lynen, Vitamins and Hormones. Acad. Press, N. Y. 28 (1970) 329
21. A. Hagen, Diss. Univ. München 1963
22. F. Lynen, in New. Perspectives in Biology, S. 132 Elsevier Publishing Comp. Amsterdam 1964
23. E. Schweizer, Diss. Univ. München 1963

24. D. Oesterhelt, Diss. Univ. München 1967
25. J. Ziegenhorn, Diss. Univ. München 1970
26. J. Ziegenhorn, R. Niedermeier, F. Lynen, Hoppe-Seyler's
Z. Ph. Ch. 351 (1970) 137
27. J. Ziegenhorn, R. Niedermeier, C. Nüssler, F. Lynen,
Eur. J. Bioch. 30 (1972) 285
28. J. Ayling, R. Pirson, F. Lynen, Biochemistry 11 (1972) 526
29. K. I. Arnstadt, Diss. Univ. München 1973
30. F. Lynen, in S.P. Colowick, N. O. Kaplan, Meth. in
Enz., 14 (1969) 17
31. H. Lineweaver, D. Burk, J. Am. Chem. Soc. 56 (1934) 658
32. K. Decker, Die aktivierte Essigsäure, F. Enke Verlag
Stuttgart, 1959
33. L. Michaelis, M. L. Menten, Bioch. Z. 49 (1913) 333
34. F. Lynen, Redoxfunktion cytoplasmatischer Strukturen,
Gem. Tagung der Ges. für Physiol. Chemie und der österr.
bioch. Ges. Wien 26.-29. Sept. 1962
35. H. B. White, III, O. Mitsuhashi, K. Bloch, J. Biol. Chem.
246 (1971) 4751
36. M. Sumper, Diss. Univ. München 1970
37. M. Sumper, D. Oesterhelt, C. Riepertinger, F. Lynen,
Eur. J. Bioch. 10 (1969) 377
38. U. Schiele, Diss. Univ. München, 1973
39. G. Hauge, J. Amer. chem. Soc. 78 (1956) 5266
40. Biochemist's Handbook Ed. C. Long, London 1961
41. H. M. Rauen, Biochemisches Taschenbuch, Teil 2, Berlin 1964
42. H. R. Maurer, Disk-Elektrophorese, Walter de Gruyter u. Co.
Berlin 1968
43. W. Seubert, Diss. Univ. München 1955
44. K. J. Laidler, P. S. Bunting, The Chemical Kinetics of
Enzyme Action, Clarendon Press, Oxford (1973)
45. K. Willecke, Diss Univ. München 1968

46. G. Lust, F. Lynen, Eur. J. Biochem., 7 (1968) 68
47. M. Yalpani, K. Willecke, F. Lynen, Eur. J. Biochem. 8 (1969) 495
48. I. R. Stern, A. DelCampillo, J. Biol. Chem. 218 (1956) 985
49. F. Lynen, O. Wieland, Meth. in Enzymology 1 (1955) 566
50. W. Seubert, G. Greull, F. Lynen, Ang. Ch. 69 (1957) 359
51. Gebrauchsanleitung, LKB-Produkte, Bromma, Schweden
52. W. W. Cleland, Biochim. Biophys. Acta, 67 (1963) 104, 173,
188. Ann. Rev. Bioch. 36 (1967) 77
53. H. J. Fromm, V. Zewe, J. Biol. Chem. 237 (1962) 3027
54. A. M. Reynard, L. G. Hass, D. D. Jacobsen, P. D. Boyer,
J. Biol. Chem. 236 (1961) 2277
55. F. B. Rudolph, H. J. Fromm, J. Biol. Chem. 246 (1971) 6611
56. E. Schweizer, I. Lerch, L. Kroeplin-Rueff, F. Lynen,
Eur. J. Bioch. 15 (1970) 472
57. U. Gehring, Diss. Univ. München 1964
58. J. D. Lueck, W. R. Ellison, H. J. Fromm. FEBS LETTERS 30 (1973) 321
59. R. Schwyzer, Helv. Chem. Acta 35 (1952) 1903
60. H. Eggerer, F. Lynen, Biochem. Z. 335 (1962) 540
61. A. Hagen, Arbeitsbericht 1961
62. G. F. Phillips, J. E. Nixon, J. A. Dorsey, P. H. W. Butterworth,
C.J. Chesterton, J. W. Porter, Arch. Biochem. Biophysics 138
(1970) 380
63. W. B. Jolley, H. W. Allen, Nature, 208 (1965) 390
64. K. Weber, M. Osborn, J. Biol. Chem. 244 (1969) 4406
65. E. M. Carey, R. Dils, Biochim. Biophys. Acta 210 (1970) 371
66. H. U. Bergmeyer, Methoden der enz. Analyse, Weinheim 1970
67. W. Pirson, Diss. Univ. München 1970
68. W. Buckel, H. Eggerer, Biochem. Z. 343 (1965) 29
69. E. Schweizer, H. Bolling, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67
(1970) 660
70. M. Dixon, F. C. Webb, Enzymes, Longmans, London 1964

71. K. Dalziel, Acta Chem. Scand. 11 (1957) 1706
72. S. E. Charm, in Meth. in Enzymology 12 (1971) 476
73. D. E. Koshland jr., K. E. Neet, Ann. Rev. Biochem. 37 (1968) 672
74. A. M. Gold, in Meth. in Enzymology 11 (1967) 706
75. N. L. Vallee, J. F. Riordan, Ann. Rev. Bioch. 38 (1969) 733
76. E. Schweizer, B. Kniep, H. Castorph, U. Holzner,
Eur. J. Biochem. 39 (1973) 353
77. K. Willecke, E. Ritter, F. Lynen, Eur. J. Biochem. 8 (1969) 503
78. G. Greull, Diss. Univ. München 1973
79. I. Stapraus, S. Watanabe, J. Biol. Chem. 245 (1970) 5962
80. J. H. Straus, A. S. Gordon, D. F. H. Wallach, Eur. J. Biochem.
11 (1969) 201
81. M. Sumper, C. Riepertinger, F. Lynen, FEBS LETTERS, 5 (1969) 45
82. F. Lynen, E. Lorch, unveröffentlichte Versuche
83. C. H. Chervenka, A Manual of Methods for the Analytical
Ultracentrifuge, Ed. Beckman Instruments, Palo Alto, 1970
84. W. W. Cleland, Biochemistry 3, (1964) 480
85. L. Sachs, Statistische Auswertungsmethoden, Berlin 1971
86. L. Shuster, B. K. Schnier, Anal. Biochem. 19 (1967) 280
87. M. Kunitz, H. S. Simms, J. gen. Physiol. 11 (1928) 641
88. E. J. Simon, D. Shemin, J. Amer. chem. Soc. 75 (1953) 2520
89. G. Michal, H. U. Bergmeyer, Biochim. Biophys. Acta 67 (1963) 599
90. K. Decker, Diss. Univ. München 1955
91. F. Lynen in S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Meth. in
Enzymology 5 (1962) 443
92. G. Beisenherz, H. J. Boltze, Th. Bücher, R. Czok, K. H. Carbade,
E. Meyer-Arendt, E. u. G. Pfeleiderer, Z. Naturforschung 8b (1953) 555
93. O. Warburg, W. Christian, Bioch. Z. 310 (1942) 384
94. F. Lynen, Liebigs Ann. Chem. 574 (1951) 33

95. L. Kühn, H. Castorph, E. Schweizer, Eur. J. Bioch. 24
(1972) 492
96. E. Schweizer, Ang. Chemie 85 (1973) 365
97. G. Burkl, H. Castorph, E. Schweizer, Mol. Gen. Genet 119
(1973) 314
98. E. R. Stadtman in Methods in Enzymology 3 (1962) 938
99. G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 74 (1958) 443
100. E. R. Stadtman, J. cell. comparat. Physiol. 41 (1953) 89

Lebenslauf

Am 14.5.1945 wurde ich in Hard/Österreich geboren. Meine Eltern sind Ludwig Weithmann, Oberamtsrat, und Charlotte Weithmann, geb. Fritzsche.

Nach dem Besuch der Volksschule in München trat ich 1955 in die Ludwigsoberrrealschule in München ein und legte dort 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1964 begann ich mit dem Studium der Chemie an der Universität München. Die Diplom-Vorprüfung legte ich im Wintersemester 1967, die Diplom-Hauptprüfung im Wintersemester 1969 ab.

Unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. F. Lynen führte ich von März 1970 bis Januar 1974 die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit aus.

